



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programas de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

SIMONE RODRIGUES CAMPELO

Leishmania (L.) amazonensis* inibe a maturação e a função ativadora das células de Langerhans da pele tratadas com TNF- α e anti-CD40 *in vitro

BELÉM - PA

2014

SIMONE RODRIGUES CAMPELO

Leishmania (L.) amazonensis* inibe a maturação e a função ativadora das células de Langerhans da pele tratadas com TNF- α e anti-CD40 *in vitro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

BELÉM - PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Campelo, Simone Rodrigues, 1983-

Leishmania (l.) amazonensis inibe a
maturação e a função ativadora das células de
Langerhans da pele tratadas com TNF-a e
anti-CD40 in vitro / Simone Rodrigues Campelo.
- 2014.

Orientador: Claudio Guedes Salgado.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia
Celular, Belém, 2014.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania. 3. Células de
Langerhans. 4. Citocinas. I. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

SIMONE RODRIGUES CAMPELO

Leishmania (L.) amazonensis* inibe a maturação e a função ativadora das células de Langerhans da pele tratadas com TNF- α e anti-CD40 *in vitro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (Presidente)
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto
Campus de Castanhal - UFPA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Francisco Acácio Alves
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dedico este trabalho ao meu esposo,
Moises Silva, por todo apoio, amor e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser um amigo presente em todos os momentos de minha vida, e que é a minha fonte de força e inspiração.

Ao professor Claudio Guedes Salgado, pela oportunidade de realização desse projeto e pela orientação ao longo desses anos. Sua contribuição científica foi fundamental para meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada pelos ensinamentos!

Ao professor Moises Batista da Silva pela imensa contribuição, dedicação e amizade. Obrigada pela paciência e pela força em todos os momentos!

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira pela disponibilização da cepa utilizada nesse trabalho e ao grupo do setor de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas por toda colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Dermato-Imunologia pela amizade, companhia, colaboração nos experimentos, momentos de descontração e discussões produtivas. Foi muito bom conhecer cada um de vocês!

Aos meus pais, irmãos, e toda a minha família pelo apoio e incentivo e por compreenderem tantos momentos de ausência.

A FAPESPA e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará pela oportunidade de executar este projeto.

A todos que estiveram próximos e que contribuíram para a realização desta obra.

RESUMO

Leishmania amazonensis é um dos principais agentes etiológicos em um amplo espectro de formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana. De modo geral, a resistência frente às leishmanioses decorre do desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente, porém muitos estudos têm demonstrado que citocinas específicas ou combinações de citocinas podem ser fatores de resistência ou suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Estudos recentes sugerem a participação das células de Langerhans (LCs) na resposta anti-*Leishmania*, porém os mecanismos envolvidos durante esta interação são ainda pouco estudados. Objetivos: Estudar o papel do TNF- α e anti-CD40 nas interações *in vitro* entre as LCs e *L. amazonensis*, observando o perfil de citocinas produzidas e a expressão de moléculas de superfície, bem como verificar a capacidade destas células em ativar a produção de IFN- γ e IL-4 por células do linfonodo. Metodologia: As LCs foram isoladas da epiderme de camundongos BALB/c e incubadas com promastigotas de *L. amazonensis*, TNF- α e/ou anti-CD40. Após 24h, as LCs foram co-cultivadas com células obtidas de linfonodos por 72h. As citocinas IL-6, IL-12, IFN- γ e IL-4 foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e as moléculas de superfície foram analisadas por citometria de fluxo. Resultados: Os níveis de IL-6 e IL-12p70 produzidos pela LCs foram significativamente reduzidos após interação com *L. amazonensis*, mesmo após o tratamento das LCs com TNF- α ou anti-CD40. Em relação às moléculas de superfície, não houve diferença na expressão de CD207 em nenhum dos grupos, porém a presença de *L. amazonensis* promoveu uma redução significativa na expressão de CD40 nas LCs tratadas com TNF- α ou anti-CD40, e aumentou a expressão de CD86 em todos os grupos. Na presença de *L. amazonensis*, as células do linfonodo apresentaram uma produção diminuída de IFN- γ e não houve alteração na produção de IL-4. Quando co-cultivadas com LCs estimuladas previamente com *L. amazonensis*, a produção de IFN- γ também foi reduzida, mesmo na presença dos estímulos TNF- α e/ou anti-CD40. Não foram observadas alterações significativas na produção de IL-4 pelas células do linfonodo co-cultivadas nas mesmas condições experimentais. Conclusão: *L. (L.) amazonensis* exerce um efeito imunomodulador sobre a resposta imune mediada por LCs, inibindo a produção de IL-6 e IL-12p70 e expressão de CD40, além de impedir a ativação da produção de IFN- γ por células do linfonodo co-cultivadas com LCs, mesmo após tratamento com TNF- α e anticorpo anti-CD40.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, células de Langerhans, citocinas.

ABSTRACT

Leishmania amazonensis is one of the agents in a wide spectrum of clinical forms of cutaneous leishmaniasis. In general, the resistance against leishmaniasis depends on the development of an efficient immune response, however many studies have demonstrated that specific cytokines or combinations of cytokines may be factors of resistance or susceptibility to infection by *L. amazonensis*. Recent studies suggest the involvement of Langerhans cells (LCs) in the anti-*Leishmania* response, but the mechanisms involved in this interaction are still poorly understood. In this study, we investigated the role of TNF- α and anti-CD40 in *L. amazonensis* interaction with LCs *in vitro*, showing the profile of cytokines produced and the expression of surface molecules, besides verifying their abilities to activate the production of IFN- γ e IL-4 by lymph node cells. Methods: Fresh immature LCs, highly purified from BALB/c mouse skin, were incubated with *L. amazonensis* promastigotes, TNF- α and/or anti-CD40 mAb. After 24 h, LCs were co-cultured with lymph nodes cells of BALB/c mice for additional 72h. Culture supernatants were tested for IL-6, IL-12p70, IFN- γ and IL-4 by ELISA, while surface molecules were analyzed by FACS. Results: The levels of IL-6 and IL-12p70 produced by LCs were significantly reduced after interaction with *L. amazonensis*, even after treatment of LCs with TNF- α or anti-CD40. Regarding surface molecules, there was no difference in the expression of CD207 in both groups, but the presence of *L. amazonensis* promoted a significant reduction in the expression of CD40 on LCs treated with TNF- α or anti-CD40, and increased expression CD86 in all groups. Lymph node cells showed a decreased production of IFN- γ in the presence of *L. amazonensis* and no change in IL-4. When co-cultured with LCs previously stimulated with *L. amazonensis*, the production of IFN- γ was also reduced, even in the presence of TNF- α and/or anti-CD40. No significant changes were observed in IL-4 by lymph cells co-cultured under the same experimental conditions. Conclusion: *L. (L.) amazonensis* exert an immunomodulatory effect on the immune response mediated by LCs by: 1) inhibiting the production of IL-6 and IL-12p70; 2) decreasing CD40 expression and; 3) preventing the activation of IFN- γ production by lymph node cells co-cultured with LCs, even after treatment with TNF- α and anti-CD40 antibody.

Key-word: *Leishmania amazonensis*, Langerhans cells, cytokines.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Viabilidade de LCs após cultivo com diferentes tratamentos e na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	31
Tabela 2: Viabilidade das células do linfonodo co-cultivadas por 72 horas com LCs pré-estimuladas com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	35
Figura 1: Formas clínicas da Leishmaniose cutânea	11
Figura 2: Formas evolutivas dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	13
Figura 3: Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 4: Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de LCs estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	32
Figura 5: <i>L. amazonensis</i> inibe a produção de IL-12p70 em culturas LCs estimuladas por TNF- α , anticorpo anti-CD40 e TNF- α + anti-CD40	33
Figura 6: Análise da expressão de CD207, CD40 e CD86 em LCs estimuladas e cultivadas na presença de <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 7: Produção de IFN- γ em co-culturas de células do linfonodo e LCs pré-estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	36
Figura 8: Produção de IL-4 em co-cultura de células do linfonodo e LCs pré-estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	37
Figura 9: Síntese dos resultados obtidos	37

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μL	Microlitro (unidade de medida volumétrica)
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CD	Grupos de Diferenciação (moléculas de superfície celular que servem como marcadores. Do inglês: <i>cluster of differentiation</i>)
DCs	Células Dendríticas (Do inglês: <i>dendritic cells</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Do inglês: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Do inglês: <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
IFN-γ	Interferon - gama
IL	Interleucina
LCs	Células de Langerhans (Do inglês: <i>Langerhans cells</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MAb	Anticorpo monoclonal (Do inglês: <i>monoclonal antibodies</i>)
mg	Miligrama (unidade de medida de massa)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (Do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>)
mL	Mililitro (unidade de medida volumétrica)
NO	Óxido Nítrico (Do inglês: <i>nitric oxide</i>)
PBS	Tampão salino fosfatado (Do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Ficoeritrina
pg	Picograma (unidade de medida de massa)
PI	Iodeto de Propídeo
RPMI	Meio de cultura originalmente desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Th1	Linfócito T tipo “helper 1”
Th2	Linfócito T tipo “helper 2”
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - alfa (Do inglês: <i>Tumor necrosis factor - alfa</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana	11
1.2. Resposta imune ao parasito	16
1.3. Células Dendríticas e Células de Langerhans	22
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. MATERIAS E MÉTODOS	28
3.1. Parasitas	28
3.2. Animais de experimentação	28
3.3. Isolamento das células de Langerhans	28
3.4. Interação de LCs com <i>L. (L.) amazonensis</i>	29
3.5. Co-cultura de LCs com células do linfonodo	29
3.6. Citometria de fluxo	30
3.7. Dosagem de citocinas	30
3.8. Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Cutânea ou Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, causada por diferentes espécies de parasitas, caracterizada principalmente pelo comprometimento do tecido cutâneo e, secundariamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e de fatores imunológicos do hospedeiro, por lesão do tecido mucoso e nasobucofaríngeo. É uma doença considerada polimorfa, devido à grande variedade dos tipos de lesões que podem se manifestar na pele. Entretanto, a úlcera leishmaniótica representa, sem dúvida, a manifestação cutânea mais comum da doença, representando as seguintes características: contornos circulares, bordas salientes e infiltradas, fundo com granulação grosseira avermelhada e com discreto exsudato (SILVEIRA *et al.*, 1997).

O gênero *Leishmania* compreende atualmente cerca de 30 espécies conhecidas, das quais 21 causam Leishmaniose cutânea em humanos (LAINSON, 1997). No Velho Mundo, entre as principais espécies cutâneas destaca-se a *Leishmania (Leishmania) major*, e seus principais vetores são insetos do gênero *Phlebotomus* (WHO, 2010). No Novo Mundo, entre as principais espécies cutâneas destacam-se a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* cujos vetores são diferentes espécies do gênero *Lutzomyia*. No Brasil são reconhecidas até o presente momento sete espécies causadoras de LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* (LAINSON, 1997; WHO, 2010), as quais têm assegurado a ocorrência de casos em todo o território nacional (BRASIL, 2009). *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* são as espécies cutâneas de maior interesse médico no Brasil, devido à gravidade e alta incidência, respectivamente.

Clinicamente, a Leishmaniose cutânea apresenta um amplo espectro de formas, classificando-se em: Leishmaniose cutânea localizada, Leishmaniose cutâneo-mucosa, Leishmaniose cutânea difusa anérgica e Leishmaniose cutânea disseminada borderline (SILVEIRA *et al.*, 2004). No caso das lesões cutâneas, o agente etiológico pode ser qualquer

espécie do subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, havendo variação na natureza da lesão conforme o agente etiológico (Figuras 1A e 1B).

L. (V.) braziliensis e *L. (L.) amazonensis* são responsáveis por quadros graves e muito resistentes ao tratamento (REITHINGER *et al.*, 2007). *L. (V.) braziliensis* está associada à forma cutâneo-mucosa, com lesões primárias únicas de grandes dimensões, ulceradas, que podem evoluir para a cura espontânea. Entretanto, em parte dos casos, anos após a infecção primária podem surgir lesões mucosas, em geral nasofaríngeas, destrutivas e mutilantes (Figura 1C). A infecção por *L. (L.) amazonensis* está associada à leishmaniose cutânea difusa (Figura 1D), com uma lesão cutânea papular primária e várias lesões satélites desenvolvendo-se ao redor desta. Formas amastigotas do parasita se disseminam produzindo nódulos cutâneos múltiplos na face e extremidades do corpo (LAINSON & SHAW, 1987). Esta doença é encontrada principalmente em áreas de floresta amazônica e a infecção por este parasito vem se tornando cada vez mais frequente pela crescente ocupação desta região (CAMUSET *et al.*, 2007). A Leishmaniose cutânea disseminada borderline apresenta quadro clínico semelhante à forma anérgica, com presença de lesões nodulares e placas infiltradas, geralmente em extremidades, sendo classificada como intermediária aos pólos imunológicos hiper e hipoérgicos (SILVEIRA *et al.* 2005).



Figura 1. Formas clínicas da Leishmaniose cutânea. (A) Leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (V.) braziliensis* com lesão ulcerada apresentando infiltração moderada; (B) Leishmaniose cutânea localizada causada por *L. (L.) amazonensis* com lesão ulcerada apresentando densa infiltração; (C) Leishmaniose cutâneo-mucosa causada por *L. (V.) braziliensis* com comprometimento da mucosa nasal e tecidos adjacentes; (D) Leishmaniose cutânea difusa causada por *L. (L.) amazonensis* com lesões nodulares. (Fonte: adaptado de SILVEIRA *et al.*, 2004)

Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros mamíferos, inclusive ao homem, pela picada de mosquitos, que realizam previamente repasto sanguíneo em um reservatório infectado (RYAN *et al.*, 1987). Os insetos são fêmeas hematófagas de diversas espécies conhecidas genericamente como flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, subgêneros *Nyssomyia* e *Psychodopygus* pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros, dependendo da localização geográfica.

A LTA é considerada originalmente uma zoonose, porém nas últimas décadas observa-se mudanças no perfil epidemiológico e atualmente ela pode ser detectada tanto no ambiente silvestre quanto peri-urbano (LAINSON & SHAW, 1987). Os flebotomíneos apresentam hábitos noturnos e são encontrados em tocas de animais, currais, chiqueiros, podendo invadir residências e abrigam-se em locais mais escuros. Com a destruição das matas nativas, os habitats naturais destes insetos foram alterados. Desse modo, as espécies que de alguma forma resistem às condições adversas conseguem explorar novos ambientes, aproximando-se cada vez mais do peri-domicílio (LAINSON & SHAW, 1998).

Na Amazônia é encontrada uma ampla cadeia de focos geograficamente diferentes e uma diversidade de reservatórios mamíferos e espécies de vetores. Dentre as espécies registradas como reservatórios de *Leishmania* estão alguns marsupiais, roedores, desdentados, procionídeos, canídeos e primatas. É possível observar que em muitas localidades, mais de uma espécie pode parasitar um mesmo hospedeiro animal e vetores, assim como pode compartilhar este hospedeiro com outros patógenos (LAINSON, 1985; LAINSON *et al.*, 1992).

Os agentes etiológicos da doença são protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. Apresenta-se sob duas formas: uma flagelada (promastigota) e outra aflagelada (amastigota) (Figura 2). A forma promastigota (14 a 20 µm de comprimento e 1,5 a 4 µm de largura) vive na luz do tubo digestório do hospedeiro invertebrado, possui corpo celular longo com núcleo situado na sua porção mediana. O cinetoplasto é uma organela rica em DNA mitocondrial e está localizado próximo à extremidade anterior, por onde sai o flagelo longo e muito móvel. As formas promastigotas dividem-se por divisão binária simples e os parasitos permanecem agrupados, formando aglomerados com aspecto de rosáceas, em geral aderidos à parede do intestino do inseto. A forma amastigota (cerca de 2 a 6 µm de comprimento e 1,5 a 3 µm de largura) é a forma

intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado. O corpo celular é ovóide, achatado, com pouco citoplasma e o núcleo é redondo, relativamente grande e excêntrico. O cinetoplasto é bem visível e localizado próximo ao núcleo (SACKS & KAMHAWI, 2001).

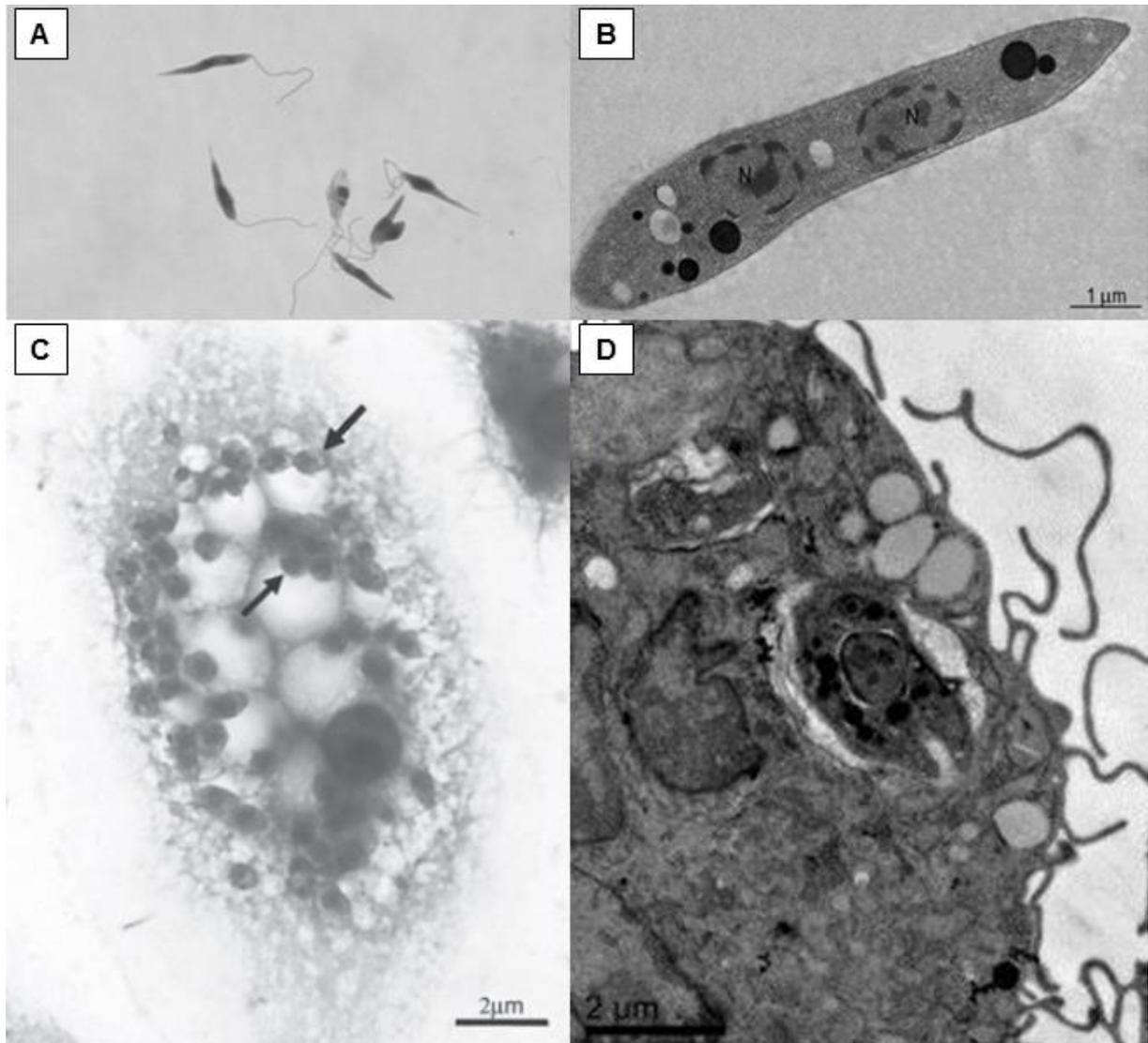


Figura 2. Formas evolutivas dos parasitas do gênero *Leishmania*. (A) Forma promastigota, que é flagelada, extracelular e apresenta corpo alongado; (B) morfologia ultraestrutural da forma promastigota mostrando o núcleo e organelas intracelulares; (C) formas amastigotas no interior de vacúolos parasitóforos; e (D) morfologia ultraestrutural da forma amastigota no interior de um vacúolo celular (Fontes: adaptado de BLUT *et al.*, 2009; MARINHO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2014; REIMÃO *et al.*, 2014).

Ao realizarem o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro vertebrado, os insetos dilaceram os tecidos superficiais da derme, levando à formação de pequenos “pools” hemorrágicos, onde depositam sua saliva, rica em componentes que auxiliarão na sua alimentação, como anticoagulantes e vasodilatadores. Ao se alimentar sobre um hospedeiro infectado, o inseto

pode ingerir células parasitadas, contendo formas amastigotas. Uma vez no interior do tubo digestivo do inseto, estas se diferenciam em formas promastigotas e se diferenciam por divisão binária. Com o declínio da concentração de nutrientes disponíveis, os parasitos se diferenciam em formas metacíclicas, infectantes para o hospedeiro vertebrado, e migram para as partes anteriores do aparelho bucal dos insetos. Ao realizar seu próximo repasto sanguíneo, o inseto inocula no hospedeiro não apenas sua saliva, mas também essas formas promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas e, uma vez no interior dos macrófagos do hospedeiro, se diferenciam novamente em amastigotas, reiniciando o ciclo de transmissão (Figura 3) (DE ALMEIDA *et al.*, 2003; AWASTHI *et al.*, 2004; LIESE *et al.*, 2008).

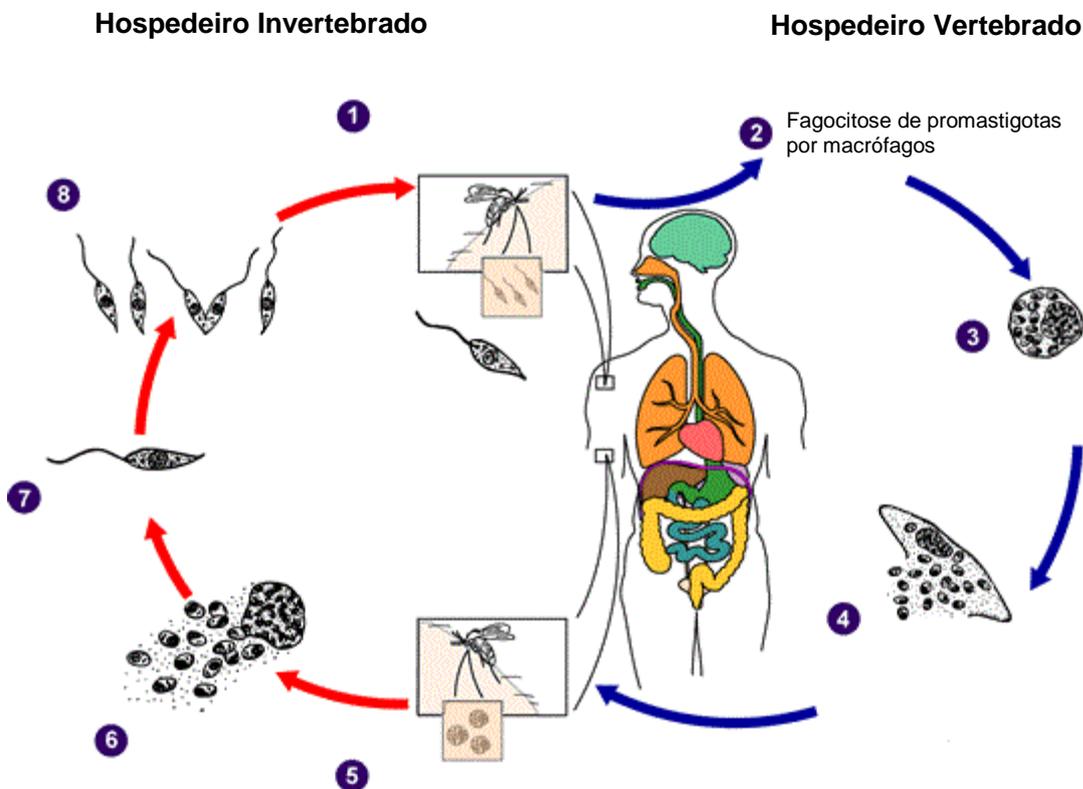


Figura 3. Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*. (1) Promastigotas metacíclicas são transmitidas ao hospedeiro após picada de fêmeas do vetor; (2) formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos do hospedeiro mamífero; (3) no interior dos macrófagos, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas; (4) as amastigotas iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular; (5) as fêmeas do vetor realizam o repasto sanguíneo; (6) e macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor; (7) no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas; (8) e posteriormente diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor (Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>, com modificações).

A *Leishmania* na forma amastigota quando internalizada reside em fagossomos que sofrem maturação e fusão com organelas endocíticas formando o vacúolo parasitóforo que morfologicamente é diferente dependendo da espécie da *Leishmania*. Por exemplo, nas espécies *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) mexicana* as formas amastigotas residem em um único vacúolo grande, enquanto que nas espécies *L. (L.) major* observam-se vários vacúolos pequenos por células, cada um contendo apenas um ou alguns poucos parasitas (SOLBACH & LASKAY, 2000). As amastigotas sobrevivem neste local e reproduzem-se por divisão binária, aumentando o número de parasitas no interior do macrófago até que ocorra a ruptura da membrana vacuolar e plasmática, liberando as formas amastigotas para o meio extracelular. Além dos macrófagos, outras células podem ser parasitadas, como neutrófilos e células dendríticas, mas não possuem capacidade potencial de eliminar o parasita e podem servir, portanto, de locais de sua sobrevivência (RITTING & BOGDAN, 2000).

1.2. Resposta imune ao parasito

Como mencionado anteriormente, diferentes formas clínicas de leishmaniose cutânea podem ser encontradas em humanos, variando com a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro, resultando em um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas na LTA. Os casos humanos de leishmaniose cutânea localizada (LCL) causada tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis*, assumem uma posição central no espectro da doença e mostram boa resposta ao tratamento com as drogas habituais, face ao seu perfil imunológico ser predominantemente Th1, o que lhe confere um alto grau de resistência imunológica à infecção. Entretanto, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imunológico do hospedeiro, algumas infecções, não totalmente controladas pelos mecanismos de imunidade celular podem evoluir para as formas polares da doença dentro do espectro clínico. No caso da infecção por *L. braziliensis*, a infecção pode evoluir para o polo hiperérgico de resposta do hospedeiro, representado pela forma de leishmaniose mucosa (LM), com perfil imunológico fortemente Th1; enquanto que no caso de infecção por *L. amazonensis*, a infecção pode evoluir para o polo hipoérgico, representado pela forma de leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD), caracterizado por um perfil imunológico nitidamente Th2 (SILVEIRA *et al.*, 2009). Entre a forma central LCL e as duas formas polares LM e LCAD, as infecções podem passar por uma forma intermediária chamada de

leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB), durante a qual a imunidade celular dos pacientes apresenta-se parcialmente deprimida ou inibida, porém, com certo grau de predomínio da resposta Th1 em relação à resposta Th2, motivo pelo qual se atribui a denominação específica borderline (SILVEIRA *et al.*, 2004)

Os estudos envolvendo os mecanismos de resposta imune nas leishmanioses são realizados, usualmente, em modelos murinos, na tentativa de se identificarem os fatores responsáveis pelos fenótipos de resistência e suscetibilidade à infecção por *Leishmania* (LAUNOIS *et al.*, 1996). O modelo experimental de infecção murina em diferentes constituições genéticas com diferentes espécies de *Leishmania* reproduz com grande similaridade as características distintas do espectro clínico visto em pacientes com leishmaniose cutânea (BEHIN *et al.*, 1979; MITCHELL *et al.*, 1981). Muitos estudos foram realizados com *L. major*, a qual a maioria das linhagens de camundongos é resistente (entre elas C57BL/6, C3H e CBA), desenvolvendo pequenas lesões com cura espontânea no local do inóculo, enquanto os camundongos BALB/c e DBA/2 são suscetíveis e desenvolvem lesões progressivas (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Em contraste, a maioria das linhagens de camundongos mostra graus variáveis de suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* e desenvolvem lesões crônicas que não curam (MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

A infecção por *L. major* exemplifica o paradigma de desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, no qual o desenvolvimento da doença é determinado pela natureza e magnitude da resposta das células T CD4⁺ e produção de citocinas no início da infecção (MOSMANN & COFFMAN, 1989). A resistência de camundongos à infecção por *L. major* está relacionada a uma diferenciação e expansão de células Th1 específicas para *Leishmania* direcionada pela citocina IL-12 (HEINZEL *et al.*, 1989; HEINZEL *et al.*, 1991; HEINZEL *et al.*, 1993). Este subgrupo de linfócitos produz interferon- γ (IFN- γ), o qual contribui para a ativação de macrófagos e consequente produção de óxido nítrico (NO) responsável pela morte do parasito (BELOSEVIC *et al.*, 1988; STENGER *et al.*, 1994). Por outro lado, a suscetibilidade a *L. major* está correlacionada ao desenvolvimento de uma resposta de células Th2 e inabilidade de gerar uma resposta celular Th1 (REINER & LOCKSLEY, 1995). Nestes casos, a produção de citocinas tais como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β , que inibem ou diminuem a ativação de macrófagos, participa do desenvolvimento da doença (GROUX *et al.*, 1999; KANE; MOSSER, 2001; MATTHEWS *et al.*, 2000; NOBEN-TRAUTH *et al.*, 1999).

No caso das infecções com *L. amazonensis*, observa-se um perfil diferente, pois a maioria das linhagens de camundongos resistentes à *L. major* são suscetíveis à *L. amazonensis*. O desenvolvimento de lesões em camundongos C57BL/6 e C57BL/10 infectados com esse parasito não foi associado a uma resposta Th2, mas a uma fraca resposta Th1 (AFONSO & SCOTT, 1993; SOONG *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a inabilidade de montar uma resposta Th1 eficiente, independente de uma resposta Th2 induzida por IL-4 está associada a uma inabilidade de produzir ou responder à IL-12 através da inibição da expressão da cadeia beta do receptor de IL-12 (IL-12R β 2) (JONES *et al.*, 2000).

Apesar de várias evidências apontarem para a participação das células T CD4⁺ no controle da infecção por *Leishmania*, a função das células T CD8⁺ ainda não foi bem definida. Estas células iniciam sua resposta ao patógeno quando reconhecem antígenos específicos apresentados por moléculas MHC I em associação com sinais coestimulatórios das células apresentadoras de antígeno (BOURGEOIS *et al.*, 2002; SCHOENBERGER *et al.*, 1998). Para se tornarem totalmente ativadas, as células T CD8⁺ dependem das células T CD4⁺ e de células dendríticas (DCs) (MELIEF, 2003). As células T CD8⁺ podem produzir quantidades substanciais de IFN- γ (SALGAME *et al.*, 1991) e podem participar da regulação inicial das respostas de citocinas produzidas por células T CD4⁺. O modelo murino de leishmaniose sugere que as células T CD8⁺ participam do controle da infecção através da produção de IFN- γ e de sua capacidade citotóxica. Seu efeito citotóxico é exercido através da exocitose de grânulos líticos e da expressão de FasL/CD95L, ambos mecanismos indutores de apoptose (TRAPANI & SMYTH, 2002).

Diferentes parâmetros influenciam a via de diferenciação das células T CD4⁺ precursoras, incluindo o tipo de células apresentadoras de antígeno (APC), natureza dos sinais co-estimulatórios (KUCHROO *et al.*, 1995), extensão da interação do receptor de células T (TCR) (CONSTANT *et al.*, 2002), dose de antígeno (HOSKEN *et al.*, 1995), rota de administração do antígeno (GUERY *et al.*, 1996) e número de divisões celulares (BIRD *et al.*, 1998). Entre estes diferentes sinais polarizadores de células T, as citocinas são reconhecidas como indutores cruciais da diferenciação em células Th1 e Th2.

Uma citocina crítica para o desenvolvimento de resistência mediada por células Th1 é a IL-12. A citocina IL-12 bioativa, chamada IL-12p70, é formada pelas subunidades IL-12p40 e IL-12p35. A subunidade p40, sintetizada em excesso em relação à subunidade p35, é

produzida exclusivamente em DCs e macrófagos (ZHANG & WANG, 2008). É importante para a diferenciação e proliferação de células T CD4⁺ Th1 (ALEXANDER & BRYSON, 2005) e para a ativação das células NK, fonte primária de IFN- γ (ALEXANDER *et al.*, 1999). Por sua vez, esta citocina ativa macrófagos, resultando na produção de NO e morte dos parasitas (ALEXANDER & BRYSON, 2005). Assim, a IL-12 tem grande participação da iniciação de uma resposta celular protetora frente à leishmaniose (AFONSO *et al.*, 1994).

Outra citocina com função crucial na resistência à infecção à *Leishmania* é o IFN- γ . Sua participação na diferenciação de células Th1, eliminação do parasito e recrutamento celular foi demonstrada em vários estudos. A ativação de macrófagos a um estado parasiticida por IFN- γ é o principal mecanismo efetor anti-*Leishmania*. Esta citocina aumenta a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) levando à produção, a partir de L-arginina, de radicais reativos de nitrogênio tóxicos para o parasito (GREEN *et al.*, 1990a; GREEN *et al.*, 1990b; LIEW; LI; MILLOTT, 1990; ASSREUY *et al.*, 1994). O IFN- γ também exerce efeito indireto sobre o recrutamento de leucócitos, por meio da indução da expressão de vários genes de quimiocinas (FARBER, 1997).

Enquanto a resistência contra infecção está claramente associada a uma resposta Th1 induzida por IL-12 e IFN- γ , estudos usando vários modelos experimentais, entre eles camundongos geneticamente deficientes, têm questionado a importância da IL-4 no desenvolvimento de lesões crônicas e investigado outros mediadores alternativos. Estudos *in vivo*, estabeleceram que a IL-4, durante o estágio inicial da infecção, tem uma função importante no desenvolvimento de células Th2. A primeira evidência foi que a administração de anticorpos anti-IL-4 a camundongos BALB/c no início da infecção eliminava a polarização Th2, permitindo uma expansão de células Th1 e consequente cura da lesão (SADICK *et al.*, 1990). O camundongo C57BL/6 e outras linhagens resistentes, entretanto, não montaram uma resposta inicial com produção de altos níveis de IL-4 seguinte à infecção por *L. major* ou injeção do antígeno LACK de *L. major* (LAUNOIS *et al.*, 1995).

O papel da IL-10 no desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 também tem sido abordado. O tratamento de camundongos resistentes e suscetíveis com anticorpo anti-IL-10 não alterou o fenótipo destes camundongos. Foi encontrada uma produção similar de IL-10 na fase crônica de infecção em ambas as linhagens de camundongos, em contraste com uma produção significativamente mais elevada nos camundongos suscetíveis na fase inicial de

infecção (CHATELAIN *et al.*, 1999). Outros estudos mostram que a IL-10 inibe a atividade citotóxica dos macrófagos (MOORE *et al.*, 1993; MOSMANN, 1994). A adição de IL-10 a culturas de macrófagos inibiu quase completamente a morte dos parasitos intracelulares (VIETH *et al.*, 1994). Além disto, a interação da *Leishmania* com receptores na superfície do macrófago induziu preferencialmente a produção de altos níveis de IL-10. A IL-10 produzida pelos macrófagos infectados inibiu a ativação dos mesmos e diminuiu sua produção de citocinas inflamatórias (KANE & MOSSER, 2001).

O TNF- α participa do controle da infecção de macrófagos humanos por *L. amazonensis* (AFONSO *et al.*, 2008) e da indução da migração de DCs para o linfonodo drenante da infecção, no modelo murino (RITTER *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* com macrófagos murinos mostraram que a ativação do macrófago por IFN- γ e TNF- α provoca a produção de NO resultando na morte da *L. major* (BELOSEVIC *et al.*, 1988; LIEW *et al.*, 1990). O TNF é uma citocina pleiotrópica que participa de funções protetoras contra diversos patógenos, mas também pode estar associada com patologia (VASSALLI, 1992). Suas ações são mediadas por dois receptores, TNFRp55 e TNFRp75. O primeiro parece envolvido na maioria dos efeitos conhecidos do TNF- α . Esta citocina possui ação pró-inflamatória na fase inicial de infecção e função antiinflamatória e de reparo após controle do parasitismo (LIEW *et al.*, 1990). Foi demonstrada sua participação na indução de expressão de moléculas de adesão (MACKAY *et al.*, 1993), na eliminação de parasitos (FLYNN *et al.*, 1995; GREEN *et al.*, 1990a; LIEW *et al.*, 1989; PFEFFER *et al.*, 1993) e na indução de apoptose (LEIST *et al.*, 1995; TARTAGLIA *et al.*, 1993; WONG & GOEDDEL, 1994).

A suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* parece estar relacionada a falhas na indução de citocinas que são importantes para o desenvolvimento de células Th1 e funções efetoras dos macrófagos. Estudos iniciais demonstraram que a polarização da resposta celular em Th1 e Th2 encontrada no modelo de infecção murina por *L. major* não se repetia em infecções por *L. amazonensis*. Camundongos C57BL/6 ou C57BL/10 infectados com *L. amazonensis* produziram pouco ou nenhum IFN- γ e uma produção de IL-4 foi observada apenas nas primeiras semanas de infecção (AFONSO & SCOTT, 1993; JI *et al.*, 2002), sugerindo uma fraca resposta imune mediada por células T ou uma resposta celular mista, como a encontrada na leishmaniose humana (PIRMEZ *et al.*, 1993; SILVEIRA *et al.*, 1991). Ainda, o tratamento com anti-IL-4 ou anti-IFN- γ não mostrou efeito significativo no curso de infecção por *L. amazonensis* (AFONSO & SCOTT, 1993). Estes estudos sugerem que

mecanismos múltiplos podem contribuir para a suscetibilidade do camundongo a esta espécie de *Leishmania*.

Devido a importante função da IL-12, IFN- γ e TNF- α no mecanismo de resistência a leishmaniose, várias pesquisas avaliam a participação destas citocinas na infecção por *L. amazonensis*. O desenvolvimento de uma resposta Th1 é dependente da presença de IL-12 bem como da habilidade das células T responderem a esta citocina. Foi demonstrado também que camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram um atraso e uma expressão diminuída da IL-12 no sítio de infecção e linfonodos drenantes quando comparados com o controle infectado com *L. major* (JI *et al.*, 2003). Quanto à participação do IFN- γ na resistência à infecção por *L. amazonensis*, sua função ainda é controversa. O IFN- γ produzido pelas células T CD4⁺ durante a infecção com *L. amazonensis* seria consistente com o perfil Th1. No entanto, as células T CD4⁺ também promovem lesões em camundongos infectados com *L. amazonensis* (SOONG *et al.*, 1997; TERABE *et al.*, 2000). Os mecanismos que permitem a persistência da *L. amazonensis* são paradoxais, pois o IFN- γ possui uma função inflamatória associada ao recrutamento e retenção celular (FARBER, 1997; KULIDJIAN *et al.*, 2002), e o recrutamento de monócitos e macrófagos é fundamental para a sobrevivência e persistência da *Leishmania* (SCOTT, 1985; SCOTT *et al.*, 1983).

Camundongos infectados por *L. amazonensis* apresentam, no sítio de infecção, muitos macrófagos, a maioria dos quais vacuolados e altamente infectados (LEMONS *et al.*, 2000; SOONG *et al.*, 1997). O agente parece ter a capacidade de inibir a ativação de macrófagos ou resistir aos mecanismos leishmanicidas destas células (RAMOS *et al.*, 2014). Um importante fator para a sobrevivência do parasito é uma menor resposta dos macrófagos à ativação por citocinas. Existem evidências que indicam que em infecções por *L. amazonensis* concentrações inadequadas de IFN- γ podem reverter sua ação protetora facilitando a replicação acentuada das amastigotas nos macrófagos murinos. Entretanto, quando associado ao LPS, o IFN- γ foi capaz de estimular macrófagos e limitar a replicação das amastigotas (QI *et al.*, 2004; WANASEN *et al.*, 2007). Outros estudos mostram que a adição de TNF- α em culturas de macrófagos ativadas com IFN- γ acentua a atividade leishmanicida destes macrófagos (GOMES *et al.*, 2003). Embora a *L. amazonensis* seja mais resistente à morte por mecanismos induzidos por IFN- γ que a *L. major*, estes parasitas podem ser destruídos quando os macrófagos são ativados por ambos, IFN- γ e TNF- α .

Em experimentos *in vivo*, foi demonstrado que o estabelecimento e disseminação da infecção por *L. amazonensis* não estava relacionado a uma inabilidade do macrófago em produzir NO, mas que, em comparação a *L. major*, a *L. amazonensis* é mais resistente sendo morta por maiores níveis de NO ou outros mecanismos produzidos na fase inicial de infecção (LEMOS *et al.*, 2000). Assim, apesar da resposta imune contra *L. amazonensis* ser diferente da resposta à *L. major*, os resultados descritos demonstram que a produção de IFN- γ e NO são críticos no controle da infecção por *L. amazonensis*.

1.3. Células Dendríticas e Células de Langerhans

As DCs são responsáveis pela captura, processamento e apresentação de antígenos para células da imunidade adquirida, os linfócitos T. Sendo assim, as DCs são chamadas de APCs profissionais (do inglês “antigen presenting cells”) e são especializadas nos processos que envolvem a apresentação de antígenos para linfócitos T (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1999). Foram descobertas por Steinman e Cohn no início dos anos 70 (STEINMAN & COHN, 1973), no entanto, sua completa caracterização e identificação só foram publicadas na segunda metade dos anos 70 (Steinman e Witmer, 1978; Steinman e Nussenzweig, 1980). A partir do momento em que foi comprovada a importância das DCs nas reações leucocitárias mistas (do inglês MRL – mixed leukocyte reaction), como potente estimuladora de leucócitos e participação na rejeição de transplantes, os trabalhos sobre estas células tornaram-se mais frequentes (INABA & STEINMAN, 1985). Atualmente, sabe-se que as DCs estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo, desde o sangue até os órgãos linfóides, funcionando como sentinelas do sistema imune, fagocitando e processando antígenos provenientes de diferentes partes do organismos (BANCHEREAU *et al.*, 2000; MELLMAN, 2005; UENO *et al.*, 2007).

Para que ocorra uma resposta imune adequada contra patógenos, é necessário que haja a ativação adequada de linfócitos T imaturos. Dentro deste contexto, ocorrem dois sinais principais: o primeiro sinal consiste no reconhecimento do complexo de MHC-peptídeo nas APCs pelos receptores dos linfócitos T (TCR) específicos para o antígeno (SCHWARTZ, 2003); o segundo sinal ocorre através da interação de moléculas co-estimulatórias, por exemplo, B7 (CD80 e CD86), presentes na superfície de APCs, com seus ligantes CD28 e

CTLA-4 expressos na superfície de linfócitos (YOUNG *et al.*, 1992; GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Outro sinal importante consiste na interação de moléculas de CD40-ligante (CD40L ou CD154), presente na superfície dos linfócitos com a molécula CD40, localizada na superfície de DCs ativadas (COOLS *et al.*, 2007). Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-12, tem um efeito importante na manutenção destes “sinais”, contribuindo fortemente para a indução de uma resposta linfocitária eficiente (CURTSINGER *et al.*, 1999; CURTSINGER *et al.*, 2003; HUGUES, 2010).

As DCs na pele são importantes APCs que realizam o compartilhamento cutâneo com o linfonodo de drenagem. São descritas duas principais subpopulações de DCs na pele normal, as células de Langerhans epidérmicas (LCs) e as células dendríticas dérmicas (VALLADEAU & SAELAND, 2005). Curiosamente, as LCs foram inicialmente descritas como células do sistema nervoso, em 1868 por Paul Langerhans, e apenas 100 anos mais tarde foram estabelecidas como importantes APCs pertencentes ao sistema leucocitário (SCHULER & STEINMAN, 1985; CLAUSEN & KEL, 2010).

Durante o processo de migração da pele para o linfonodo, as LCs passam por uma fase de maturação e adquirem potentes propriedades imunoestimulatórias. Elas capturam, processam e apresentam antígenos adquiridos na pele via moléculas MHC classe II para as células T virgens. Também ocorre aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície celular, como CD40, CD80 e CD86, e aumento da secreção de citocinas, fornecendo um segundo e terceiro sinais para a ativação e diferenciação das células T. Assim, quando as LCs chegam ao linfonodo de drenagem, adquirem um fenótipo de DC funcionalmente madura, com capacidade de ativar células T virgens e assim iniciar uma resposta imune eficiente, especialmente adaptada para combater patógenos na pele (IGYARTO & KAPLAN, 2010).

As LCs constituem aproximadamente 1 a 5% da população de células da epiderme, formando uma rede nas camadas basal e suprabasal (HANAU *et al.*, 1991). São células de morfologia dendrítica, identificadas ultra-estruturalmente pela presença de Langerina (CD207), uma lectina tipo C responsável pela formação dos grânulos de Birbeck. Presente tanto na epiderme de camundongos quanto na epiderme de humanos, a langerina é um marcador chave para a linhagem de LCs (VALLADEAU *et al.*, 2000; VALLADEAU, 2002).

Na leishmaniose, os macrófagos da derme são as células hospedeiras mais parasitadas (LOCKSLEY *et al.*, 1988), sendo também as células efectoras mais importantes para a produção de NO, que é um potente agente leishmanicida (STENGER *et al.*, 1994). Por sua vez, as LCs normalmente são infectadas com uma ou duas amastigotas por célula e restringem a replicação parasitária de maneira independente do NO (BLANK *et al.*, 1996), mas são críticas na indução da resposta imune específica por serem responsáveis pelo transporte de parasitos aos linfonodos regionais, local onde esta resposta se inicia (MOLL, 1993; MOLL *et al.*, 1995).

Inicialmente, na década de 90, Moll e colaboradores (1993) propuseram que após a infecção por *Leishmania* na pele, as LCs migrariam da epiderme para a derme, fagocitando os parasitas, e após processar o microrganismo, expressariam seus antígenos na superfície celular associados às moléculas MHC classe II. Parte das LCs infectadas provavelmente migram para o linfonodo regional, onde então apresentam os antígenos processados aos linfócitos T não ativados, na região paracortical. Os linfócitos T ativados migram pela corrente sanguínea para a área onde ocorreu a infecção e então passariam a regular a secreção de citocinas, a atividade efectora dos macrófagos infectados e de outras LCs remanescentes na derme. Em 1995, o mesmo grupo analisou o sítio de ocupação antigênica no MHC do tipo II, assim como a biossíntese e renovação de suas moléculas em LCs infectadas com *L. major*, e mostrou que ocorria uma ligação estável dos peptídeos do parasita com MHC classe II, resultando na formação acentuada de dímeros $\alpha\beta$ compactos que resistiam à dissociação com SDS (dodecil sulfato de sódio). Além disso, a meia-vida dos dímeros do MHC classe II carregando antígenos do parasita foi significativamente maior nas LCs quando comparada aos macrófagos. Esses achados indicaram que a *L. major* modifica a síntese dos produtos do MHC classe II e possivelmente a formação da cadeia invariável nas LCs. Como resultado, as diferentes espécies de parasitas podem influenciar na capacidade de apresentação de antígenos pelas LCs, modulando a resposta imune do hospedeiro.

Muitos estudos têm discutido sobre uma subpopulação de células T CD4⁺ regulatórias especializadas nas infecções por *Leishmania*, denominadas Treg, que medeiam a supressão de células do sistema imune através da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β (ASSEMAN *et al.*, 1999), e também através do contato celular (FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004). Dentro desse contexto, tem sido descrito o envolvimento de DCs maduras na manutenção da tolerância imunológica, através da indução de células T CD4⁺ regulatórias *in vivo* (AKBARI

et al., 2001; MCGUIRK *et al.*, 2002), sugerindo também que existem diferentes estágios de maturação. Dependendo do estímulo, pode ocorrer o desenvolvimento de DCs totalmente maduras e imunogênicas ou de DCs em um estado de “semi-maturação”, sendo que ambos os tipos apresentam maturação fenotípica, mas diferem em sua capacidade de produzir citocinas. Sabe-se que os sinais que induzem a produção de citocinas por DCs maduras estão associados ao reconhecimento direto (SCHULZ *et al.*, 2000) ou indireto (AMIGORENA & BONNEROT, 1999) de patógenos, porém outros estímulos também podem estar associados. Por exemplo, a maturação de DCs pode ser promovida por diferentes citocinas, como IL-1, TNF- α e GM-CSF (KIMBER & CUMBERBATCH, 1992; SALGADO *et al.*, 1999), e uma das influências mais importantes na maturação destas células está relacionada à sinalização através de CD40 (CAUX *et al.*, 1994), que é capaz de induzir a produção de IL-12p70 *in vivo* (SCHULZ *et al.*, 2000), mas somente em combinação com patógenos pode induzir DCs totalmente maduras e capazes de gerar resposta Th1 (LUTZ & SCHULER, 2002). Além disso, estudos mostram que membros da superfamília TNF, como o TNF- α e CD40L, podem cooperar na ativação de CDs quando utilizados em combinação, potencializando seus efeitos estimulatórios (QIGUI *et al.*, 2003). Observam-se então diferentes perfis de ativação que dependem de fatores presentes durante processo de maturação das DCs, o que pode ser determinante no tipo de resposta a patógenos.

Outro estudo demonstrou que amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de infectar e ativar DCs (CD11c⁺) *in vitro*, resultando na produção de IL-4 e falha na produção de IL-12 e desencadeamento de uma resposta imune T CD4⁺ Th2 (QI *et al.*, 2001). As DCs infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* mostram-se menos maduras e menos potentes na apresentação de antígenos do que quando infectadas com promastigotas, reduzindo sua capacidade de ativação das células T CD4⁺, o que sugere que a *L. amazonensis*, especialmente na sua forma intracelular, está envolvida em uma estratégia única de suprimir eventos iniciais da imunidade inata, resultando no comprometimento das funções das DCs e da ativação da resposta Th1 (XIN *et al.*, 2008).

Também tem sido discutida a participação das células dendríticas da derme nas respostas anti-*Leishmania*. Brewington e colaboradores (2009) propuseram um novo conceito, onde a ativação de células T CD4⁺ é mediada por DCs dérmicas langerina⁻, enquanto que as DCs dérmicas langerina⁺ estão envolvidas na ativação inicial de célula T CD8⁺. A depleção das LCs e não das DCs langerina⁺ resulta na redução da imigração de células Treg e no

aumento da resposta Th1, resultando em uma doença atenuada (KAUTZ-NEU *et al.*, 2011), sugerindo que as LCs podem corroborar com o desenvolvimento de uma resposta Th2. Em outro estudo, Silveira e colaboradores (2009) relataram um aumento na densidade das LCs na pele de pacientes infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, porém este aumento se desloca no espectro clínico da doença para o polo hipoérgico, causado pela infecção por *L. amazonensis* e identificados com a forma clínica de leishmaniose cutânea anérgica difusa. Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo aprofundar os conhecimentos sobre a interação entre as LCs e *L. amazonensis*, um parasita capaz de inibir a ativação de DCs e consequentemente a produção de citocinas pró-inflamatórias (QI *et al.*, 2001; XIN *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar as interações entre o parasita *L. (L.) amazonensis* e LCs de camundongos BALB/c tratadas com TNF- α e anticorpo anti-CD40, observando alterações que podem ocorrer na expressão de moléculas de superfície e na produção de citocinas pelas LCs e na indução de resposta por células do linfonodo.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Verificar os efeitos da promastigota de *L. (L.) amazonensis* sobre a produção de citocinas (IL-6 e IL-12p70) pelas LCs tratadas com TNF- α e anticorpo anti-CD40;

2.2.2. Avaliar se promastigotas de *L. amazonensis* modulam a expressão de moléculas de superfície (CD207, CD40 e CD86) em LCs tratadas com TNF- α e anticorpo anti-CD40;

2.2.3. Analisar a influência de promastigotas *L. amazonensis* na capacidade das LCs tratadas com TNF- α e anticorpo anti-CD40 em ativar uma resposta de linfócitos T, através da avaliação do perfil de citocinas produzidas (IFN- γ e IL-4) em co-culturas de células do linfonodo e LCs.

3. METODOLOGIA

3.1. Parasitas

A cepa MHOM/BR/26361 de *Leishmania (L.) amazonensis* foi gentilmente cedida pelo Dr. Fernando Tobias Silveira, coordenador do Laboratório de Leishmaniose do Instituto Evandro Chagas (IEC). As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram obtidas pelo isolamento de formas amastigotas presentes na pata traseira de camundongos BALB/c, e posteriormente foram isoladas e expandidas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA) e solução de estreptomicina/penicilina (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.2. Animais de experimentação

Foram utilizados de 4 a 6 camundongos da linhagem BALB/c fêmeas por experimento, com idade entre 6 a 8 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Unicamp (Cemib). Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Dermato-Imunologia.

3.3. Isolamento de células de Langerhans

As células foram isoladas, purificadas e cultivadas conforme método previamente descrito (SALGADO *et al.*, 1999). Os camundongos BALB/c foram sacrificados e a pele foi removida das regiões dorsal e ventral. Os fragmentos de tecido epitelial foram incubados em meio RPMI 1640 contendo 3000 U/ml de dispase II (Roche, Germany) a 37 °C, 5% de CO₂ por 3 horas. A epiderme foi separada da derme e incubada com DNase (0.025%; Sigma, St. Louis, MO, USA) por 20 minutos em temperatura ambiente e, após pipetagem, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ia^d 1:600 (BD Pharmingen, San Diego, CA) por 1 hora à 4°C. A suspensão de células epidérmicas marcada foi então incubada em placas previamente revestidas com anticorpo anti-IgG fração Fc em uma concentração de 1:100 (MP

Biomedicals, Solon, OH, USA) por 1 hora à 4°C. Após lavagem, as placas foram submetidas à pipetagens vigorosas para remover as LCs aderidas, que foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco, Grand Island, NY, USA), solução de estreptomicina/penicilina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 2β-mercaptoetanol (Merck, Germany) e então foram cultivadas em placas de 96 poços, a 37 °C, em ambiente de 5% de CO₂.

3.4. Interação de LCs com *L. (L.) amazonensis*

Após o isolamento e purificação das LCs a partir da epiderme, as células foram ajustadas para 1×10^5 /ml e incubadas em placas de 96 poços na presença de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (proporção de 10 parasitas para cada LC), TNF-α (1 ng/ml; BD Pharmingen, San Diego, CA) e/ou anticorpo monoclonal anti-CD40 (20μg/ml; BD Pharmingen, San Diego, CA) . As células foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados para quantificação de citocinas.

3.5. Co-cultura de LCs com células do linfonodo

Os animais foram sacrificados e os linfonodos poplíteos foram coletados e macerados para a obtenção das células linfóides. As células em suspensão foram ajustadas para 1×10^6 /ml em RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, solução de estreptomicina/penicilina e 25mM de HEPES (10 μmM; Sigma, St. Louis, MO, USA) e em seguida foram cultivadas em placas de 24 poços. As células foram co-cultivadas com LCs previamente cultivadas por 24 horas sem estímulo, ou previamente estimuladas por 24 horas com promastigotas de *L. amazonensis*, TNF-α e/ou anticorpo monoclonal (MAb) anti-CD40. As LCs foram lavadas com meio RPMI 1640 e adicionadas à co-cultura, em duplicata, na proporção de 1:5 (LC:célula linfóide), e incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados para quantificação de citocinas.

3.6. Citometria de fluxo

Após 24 horas de incubação, as LCs cultivadas na presença de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, TNF- α e/ou mAb anti-CD40 foram coletadas para análise por citometria de fluxo. Após lavagens consecutivas com solução salina, as células foram marcadas com solução iodeto de propídeo (PI) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo ou foram incubadas por 1 hora com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: anti-CD40-FITC (Rat IgG2a; eBioscience, San Diego, CA), anti-CD86-PE (Rat IgG2a; eBioscience, San Diego, CA), anti-CD207-Alexa Fluor 488 (Rat IgG2a; eBioscience, San Diego, CA) e/ou isotipo controle (IgG1 λ chain; BD Pharmingen, San Diego, CA). As co-culturas de CLs e células do linfonodo foram coletadas após 72 horas de incubação para análise por citometria de fluxo. Após lavagem com solução salina, as células foram marcadas com solução de PI para análise da viabilidade, ou foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-PE (Rat IgG2b; eBioscience, San Diego, CA) e anti-CD8-FITC (Rat IgG; eBioscience, San Diego, CA). Após 1 hora de incubação com os anticorpos, as amostras foram adquiridas utilizando o aparelho BD Accuri C6 (Becton & Dickinson, San Jose, CA). Após aquisição, os resultados foram analisados utilizando o programa BD Accuri C6 Software (Becton & Dickinson, San Jose, CA).

3.7. Dosagem de Citocinas

Os sobrenadantes das culturas de LCs e das co-culturas de LCs com células de linfonodo foram obtidos após 24 ou 72 horas de incubação e estocados à -20°C até o momento da dosagem de citocinas. Os ensaios foram realizados segundo as informações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Resumidamente, as placas foram sensibilizadas durante a noite a 4°C com anticorpo monoclonal anti-citocina de camundongo (IL-6, IL-12p70, IL-4 e IFN- γ) na concentração de 4 μ g/ml. No dia seguinte, a solução de anticorpo de captura foi removida e foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS + soro fetal bovino 10% por 2 horas a temperatura ambiente. Após remoção do bloqueio e lavagem das placas três vezes com PBS/Tween 0,05%, foram adicionadas as amostras, os brancos e a curva-padrão, que foram incubados à temperatura ambiente por 2 horas. A placa foi lavada novamente três vezes e foi adicionado o anticorpo de detecção anti-citocina biotilado na

concentração de 2 µg/ml. Após incubar 1 hora a temperatura ambiente e lavar a placa quatro vezes, o conjugado (peroxidase conjugada à streptavidina) foi adicionado e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavar a placa cinco vezes, adicionou-se o substrato (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina + H₂O₂ + dimetilsufóxido) e a placa foi incubada a temperatura ambiente durante a reação. Após o período de incubação, a reação foi interrompida por adição de H₂SO₄ (2N). A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 450nm (Dynex MRX Revelation, Chantilly, VA, USA) e os valores foram convertidos em pg/ml baseando-se na curva padrão.

3.8. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad-Prism Software, CA, USA). Os valores obtidos nas diferentes condições experimentais foram comparados utilizando o teste t de Student. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nos resultados representados em gráficos utilizando barras estarão representados os valores da médias \pm desvio padrão obtidas em cada condição experimental.

4. RESULTADOS

Foram avaliados os efeitos da interação de promastigotas de *L. amazonensis* sobre as LCs tratadas com TNF- α , anticorpo anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40 por 24 horas, não sendo observadas alterações significativas na viabilidade (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade de LCs após cultivo com diferentes tratamentos e na presença de promastigotas de *L. amazonensis*^a.

	LC (%)	LC + <i>L. amazonensis</i> (%)
Controle	74.8 \pm 4.4	79.3 \pm 9.4
+ TNF- α	82.3 \pm 4.4	74.1 \pm 6.7
+ anti-CD40	80.1 \pm 3.0	75.8 \pm 10.7
+ TNF- α + anti-CD40	82.4 \pm 6.7	73.6 \pm 6.0

^aAs LCs (1×10^5 /ml) foram cultivadas na presença de promastigotas de *L. amazonensis* e tratadas com TNF- α (1 ng/ml), anticorpo anti-CD40 (20 μ g/ml) ou TNF- α + anti-CD40. Após 24 horas de cultura, as células foram coletadas e marcadas com PI (10 μ g/mL) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm desvio padrão) e não apresentaram diferença estatística significativa, independente do estímulo oferecido.

Após 24 horas de estímulo (*L. amazonensis*, TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40), verificamos a produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas. Nossos resultados mostraram que nas células do grupo controle a produção de IL-6 foi de 8.1 ± 0.7 pg/ml, e quanto as células foram cultivadas na presença de *L. amazonensis* a produção foi de 5.4 ± 0.5 pg/ml, representando uma redução de 33,4% (Figura 4A). Quando tratadas com TNF- α (Figura 4B), tanto as LCs cultivadas na ausência (7.4 ± 1.1 pg/ml) quanto as cultivadas na presença de *L. amazonensis* (5.1 ± 0.9 pg/ml) apresentaram níveis de IL-6 semelhantes aos respectivos grupos não-tratados com TNF- α (Figura 4A). Entretanto, as LCs tratadas com anticorpo anti-CD40 (Figura 4C) apresentaram um aumento significativo na produção de IL-6, tanto no grupo cultivado na ausência (11.3 ± 1.9 pg/ml) quanto na presença de *L. amazonensis* (7.2 ± 0.8 pg/ml), quando comparados com os respectivos grupos não tratados (Figura 4A). Esta mesma produção foi observada nos grupos tratados com os dois estímulos simultaneamente (Figura 4D)), onde produção de IL-6 foi de 11.8 ± 1.5 pg/ml no grupo cultivado na ausência de *L. amazonensis* e de 7.5 ± 1.8 pg/ml quando na presença do parasita .

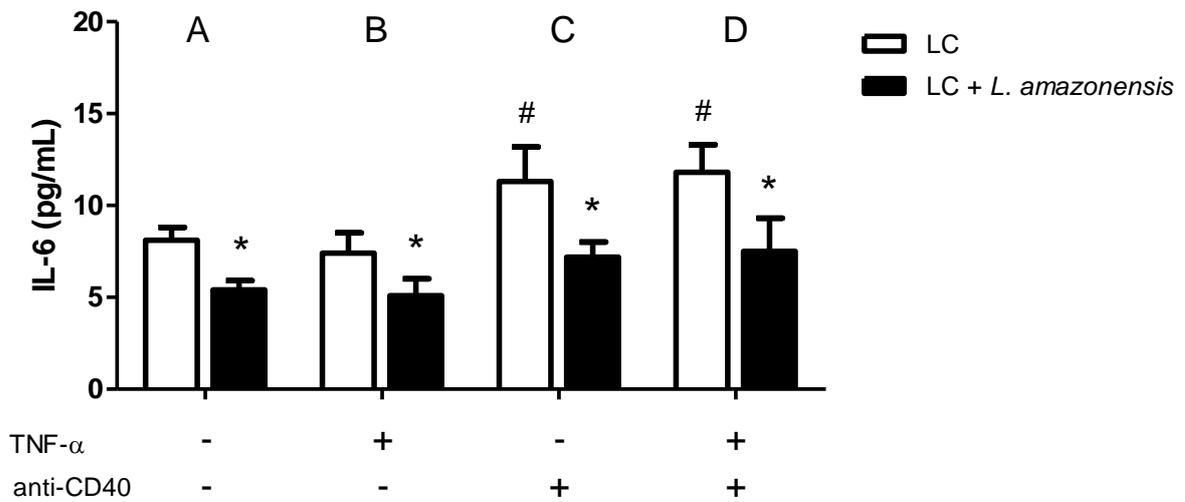


Figura 4. Produção de IL-6 nos sobrenadantes das culturas de LCs estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de *L. amazonensis*. As LCs (1×10^5 /ml) foram cultivadas na ausência ou presença de promastigotas de *L. amazonensis* (A) e tratadas com TNF- α (B), anticorpo anti-CD40 (C) ou TNF- α + anti-CD40 (D). Após 24 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. # indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo controle tratado e grupo controle sem estímulo, e * indica diferença significativa entre grupo LCs e grupo LCs + *L. amazonensis*.

Também analisamos a IL-12, uma importante citocina pró-inflamatória produzida por LCs e que exerce múltiplos efeitos na ativação de células T. Em nossos resultados observamos que as células do grupo controle (Figura 5A), cultivadas na ausência de *L. amazonensis*, produziram 3.7 ± 0.6 pg/ml e as células cultivadas na presença de *L. amazonensis* produziram 2.3 ± 0.3 pg/ml, havendo uma redução de aproximadamente 62% na produção de IL-12p70. Quando as células foram tratadas com os estímulos TNF- α (Figura 5B), CD40 (Figura 5C) ou TNF- α + anti-CD40 (Figura 5D) na ausência de *L. amazonensis*, detectamos um aumento significativo na produção de IL-12p70 (5.2 ± 1.0 pg/ml, 6.5 ± 0.7 pg/ml e 6.9 ± 1.2 pg/ml, respectivamente), quando comparado com o grupo controle (Figura 5A). No entanto, observamos que *L. amazonensis* inibiu significativamente os níveis de IL-12p70 produzidos pelas LCs tratadas com os mesmo estímulos (3.1 ± 0.7 pg/ml, 3.3 ± 0.9 pg/ml e 4.8 ± 0.5 pg/ml, respectivamente) (Figuras 5B, 5C e 5D).

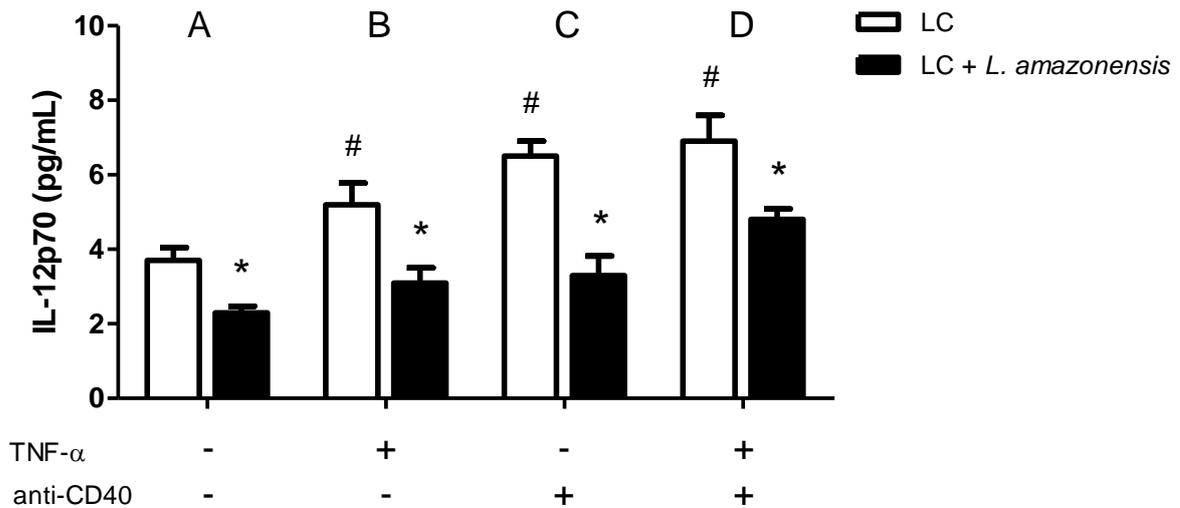


Figura 5. *L. amazonensis* inibe a produção de IL-12p70 em culturas LCs estimuladas por TNF- α , anticorpo anti-CD40 e TNF- α + anti-CD40. As LCs (1×10^5 /ml) foram cultivadas na ausência ou presença de promastigotas de *L. amazonensis* (A) e tratadas com TNF- α (B), anticorpo anti-CD40 (C) ou TNF- α + anti-CD40 (D). Após 24 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. # indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo controle tratado e grupo controle sem estímulo, e * indica diferença significativa entre grupo LCs e grupo LCs + *L. amazonensis*.

Para verificar os efeitos de *L. amazonensis* sobre a maturação fenotípica das LCs, tratadas ou não com TNF- α ou anticorpo anti-CD40, nós analisamos a expressão das moléculas CD207, CD40 e CD86 por citometria de fluxo após 24 horas de cultura (figura 6). Nossos resultados mostraram que não houve diferença na expressão de CD207 em nenhum dos grupos, quando comparado ao controle não tratado e cultivado na ausência de *L. amazonensis* (Figuras 6A e 6B). No entanto, a presença de *L. amazonensis* reduziu significativamente a expressão de CD40 na superfície das LCs (Figuras 6A e 6C). Interessantemente, a adição de TNF- α promoveu um aumento significativo na expressão de CD40 nas LCs, porém este efeito foi inibido por *L. amazonensis*. Nossos resultados mostraram que o mesmo padrão também ocorre quando adicionamos TNF- α e o anticorpo anti-CD40 simultaneamente à cultura, o que não foi observado em relação ao grupo tratado apenas com anticorpo anti-CD40, onde não houve diferença em relação ao grupo controle sem estímulo (Figuras 6A e 6C). Já em relação à expressão de CD86 nas LCs, todos os grupos apresentaram aumento significativo quando cultivados na presença de *L. amazonensis* (Figuras 6A e 6D), porém não detectamos alteração significativa em nenhum dos tratamentos utilizados (TNF- α , anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40).

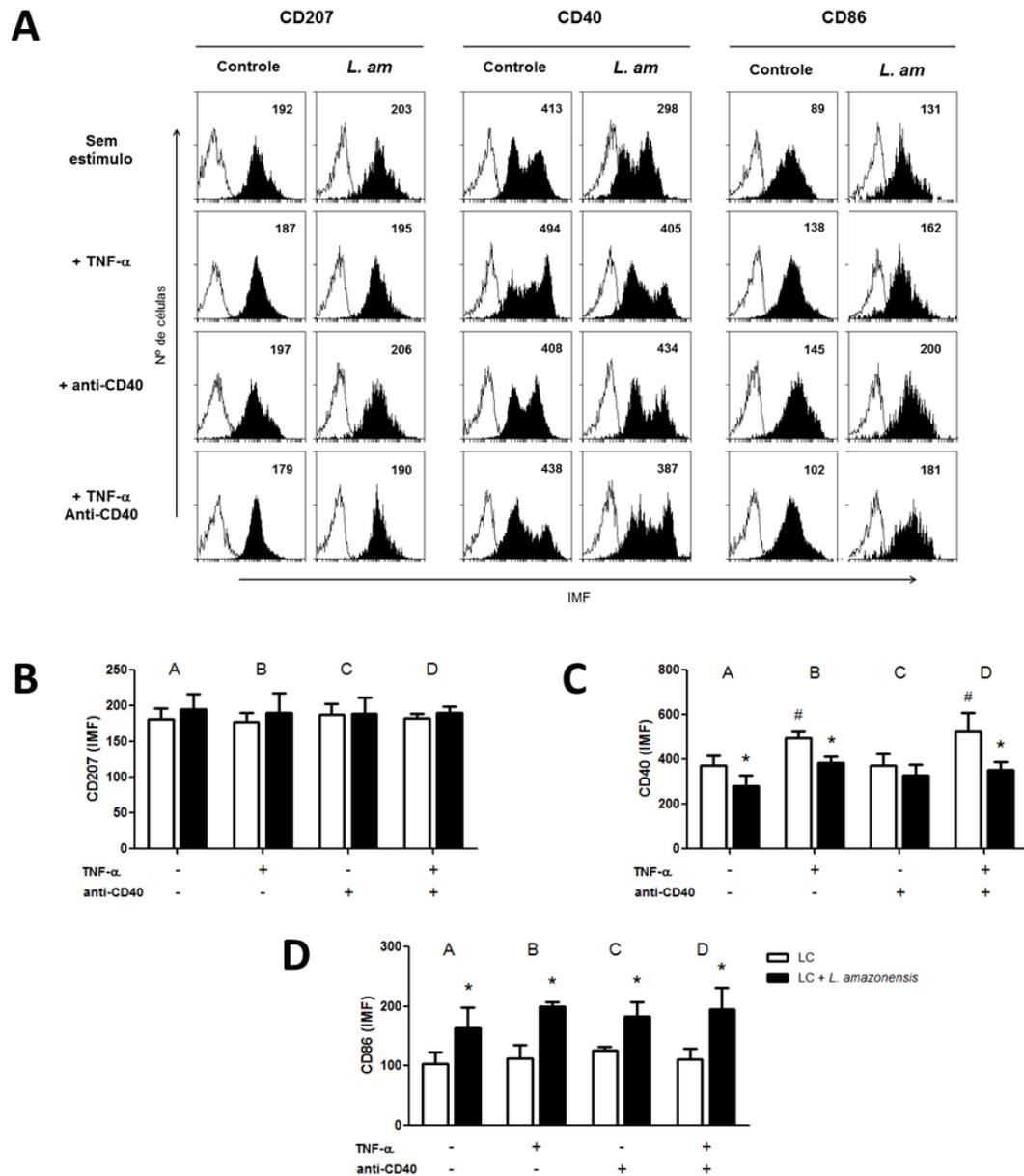


Figura 6. Análise da expressão de CD207, CD40 e CD86 em LCs estimuladas e cultivadas na presença de *L. amazonensis*. As LCs (1×10^5 /ml) cultivadas na presença de promastigotas de *L. amazonensis* e tratadas com TNF- α (1 ng/ml), anticorpo anti-CD40 (20 μ g/ml) ou TNF- α + anti-CD40. Após 24 horas de cultura, as células foram coletadas e marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD207, anti-CD40, anti-CD86 ou isotipo controle e analisadas por citometria de fluxo. (A) Experimento representativo mostrando a expressão das moléculas de superfície (em preto) ou isotipo controle (em branco) em LCs. Os números representam a intensidade média de fluorescência (IMF); *L. am*: *L. amazonensis*. (B) IMF de CD207, (C) IMF de CD40 e (D) IMF CD86 em LCs. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. # indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo controle tratado e grupo controle sem estímulo, e * indica diferença significativa entre grupo controle e grupo *L. amazonensis*.

Com o objetivo de avaliar a influência dos estímulos secundários TNF- α e anticorpo anti-CD40 na resposta das LCs contra *L. amazonensis*, utilizou-se uma abordagem

experimental onde células do linfonodo de camundongos BALB/c foram co-cultivadas com LCs previamente estimuladas com *L. amazonensis*. Após 72 horas, os sobrenadantes foram coletados para análise da resposta dos linfócitos através da dosagem das citocinas produzidas. As células coletadas não apresentaram alterações significativas na viabilidade (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade das células do linfonodo co-cultivadas por 72 horas com LCs pré-estimuladas com promastigotas de *L. amazonensis*.

	Células do linfonodo (%)	Células do linfonodo + <i>L. amazonensis</i> (%)
Controle	95.6 ± 0.8	94.7 ± 0.9
+ LC	96.5 ± 0.5	97.2 ± 1.0
+ TNF- α	94.4 ± 1.1	95.2 ± 0.7
+ anti-CD40	95.4 ± 2.0	96.1 ± 1.2
+ TNF- α + anti-CD40	94.5 ± 0.9	96.7 ± 1.3

^aAs células do linfonodo (1×10^6 /ml) foram co-cultivadas na presença de LCs pré-estimuladas com promastigotas de *L. amazonensis* e pré-tratadas com TNF- α , anticorpo anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40. Após 72 horas de co-cultura, as células foram coletadas e marcadas com PI (10 μ g/mL) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são representativos de três experimentos independentes (média \pm desvio padrão).

Inicialmente, verificou-se que a presença de promastigotas de *L. amazonensis* levou a uma diminuição significativa dos níveis de IFN- γ nos sobrenadantes das células do linfonodo do grupo controle (Figura 7A), uma vez que a produção de IFN- γ na ausência de *L. amazonensis* foi de 381.7 ± 36.9 pg/ml, e quando na presença do parasita a produção foi de 125.6 ± 27.6 pg/ml. Quando as células do linfonodo foram co-cultivadas com LCs estimuladas previamente com *L. amazonensis*, a produção de IFN- γ foi de 209.6 ± 55.5 pg/ml (Figura 7B). Observamos que quando as células do linfonodo foram co-cultivadas na presença de LCs previamente tratadas com TNF- α , anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40, os níveis de IFN- γ detectados foram de 339.8 ± 49.2 pg/ml (Figura 7C), 466.8 ± 74.1 pg/ml (Figura 7D) e 541.3 ± 99.6 pg/ml (Figura 7D), respectivamente, indicando que esses estímulos são capazes de aumentar as propriedades das LCs na ativação de células T. Porém, quando as células do linfonodo foram co-cultivadas na presença de LCs previamente tratadas com anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40 e cultivadas na presença de *L. amazonensis*, verificamos que os níveis de IFN- γ foram significativamente reduzidos (247.5 ± 64.3 pg/ml e 334.5 ± 66.7 pg/ml,

respectivamente), quando comparado com os níveis de IFN- γ das células cultivadas na ausência de *L. amazonensis*. Não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos cultivados na presença de LCs previamente tratadas apenas com TNF- α (246.6 ± 76.8 pg/ml) (Figura 7C).

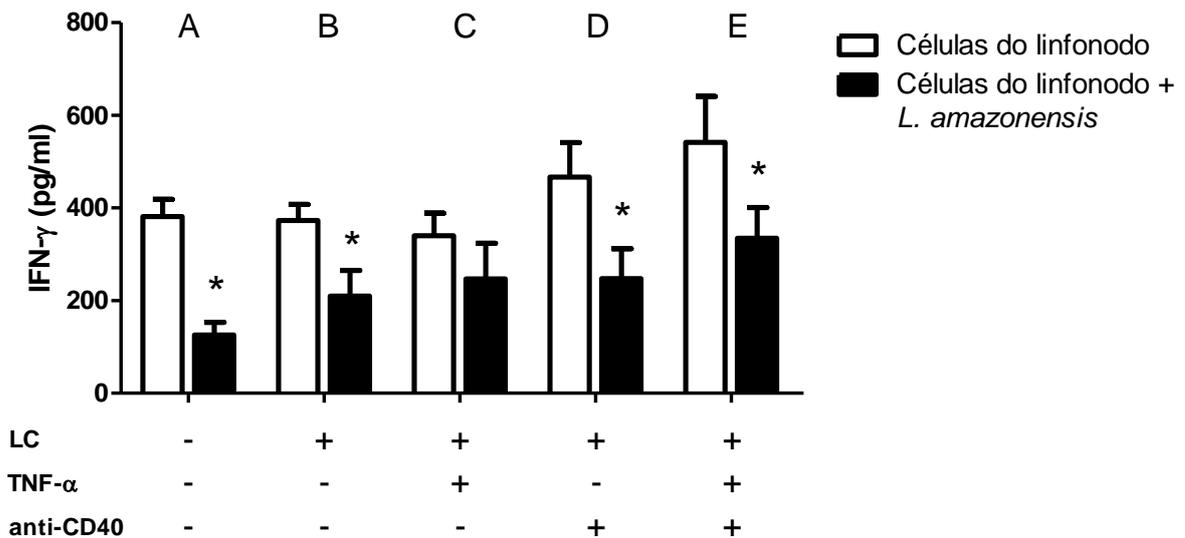


Figura 7. Produção de IFN- γ em co-culturas de células do linfonodo e LCs pré-estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de *L. amazonensis*. ^aAs células do linfonodo (1×10^6 /ml) foram co-cultivadas na ausência (A) ou presença de LCs pré-estimuladas ou não com promastigotas de *L. amazonensis* (B) e pré-tratadas com TNF- α (C), anticorpo anti-CD40 (D) ou TNF- α + anti-CD40 (E). Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. # indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo controle tratado e grupo controle sem estímulo, e * indica diferença significativa entre grupo células do linfonodo e grupo células do linfonodo + *L. amazonensis*.

Com relação a IL-4, observou-se que a presença de promastigotas de *L. amazonensis* não alterou a produção desta citocina no sobrenadante da cultura de células do linfonodo (15.0 ± 7.7 pg/ml) quando comparado com as células cultivadas na ausência de *L. amazonensis* (14.4 ± 2.7 pg/ml) (Figura 8A). Também não foram observadas alterações significativas quando as células do linfonodo foram co-cultivadas com LCs, na presença ou ausência de *L. amazonensis* (13.5 ± 2.2 pg/ml e 10.4 ± 6.6 pg/ml) (Figura 8B), LCs pré-tratadas ou não com TNF- α (13.9 ± 7.0 pg/ml e 13.2 ± 5.5 pg/ml) (Figura 8C), LCs pré-tratadas ou não com anticorpo anti-CD40 (11.1 ± 6.1 pg/ml e 16.5 ± 4.6 pg/ml) (Figura 8D) ou LCs pré-tratadas ou não com TNF- α + anti-CD40 (15.7 ± 5.0 pg/ml e 12.2 ± 6.5 pg/ml) (Figura 8E).

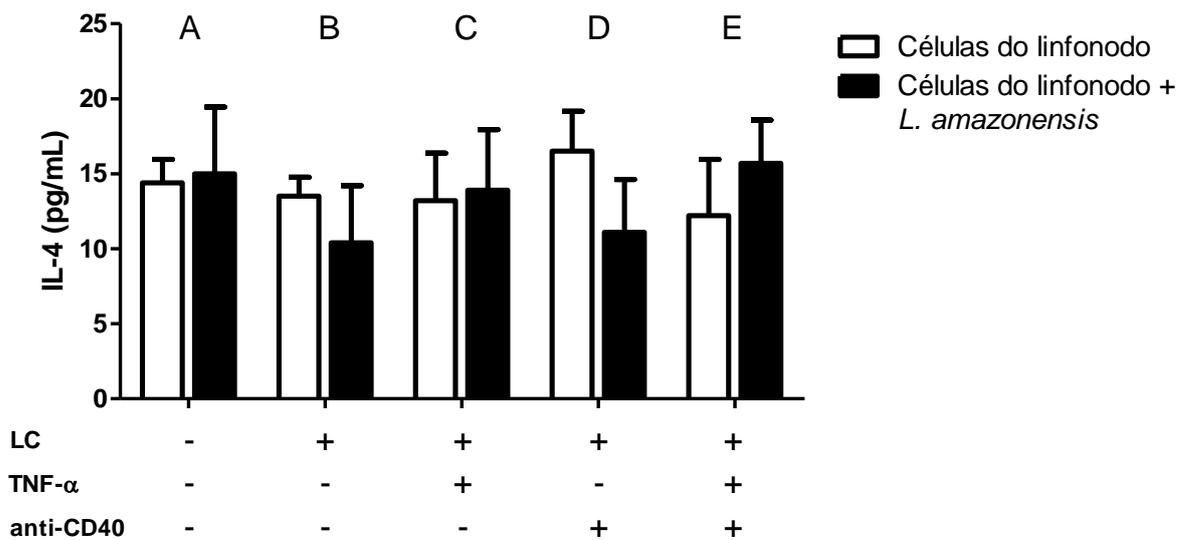


Figura 8. Produção de IL-4 em co-cultura de células do linfonodo e LCs pré-estimuladas por 24 horas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 na presença de promastigotas de *L. amazonensis*. ^aAs células do linfonodo (1×10^6 /ml) foram co-cultivadas na ausência (A) ou presença de LCs pré-estimuladas ou não com promastigotas de *L. amazonensis* (B) e pré-tratadas com TNF- α (C), anticorpo anti-CD40 (D) ou TNF- α + anti-CD40 (E). Após 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as citocinas foram dosadas por ELISA. Os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. # indica diferença significativa ($p < 0.05$) entre grupo controle tratado e grupo controle sem estímulo, e * indica diferença significativa entre grupo células do linfonodo e grupo células do linfonodo + *L. amazonensis*.

Em síntese, nossos resultados podem ser ilustrados conforme a Figura 9.

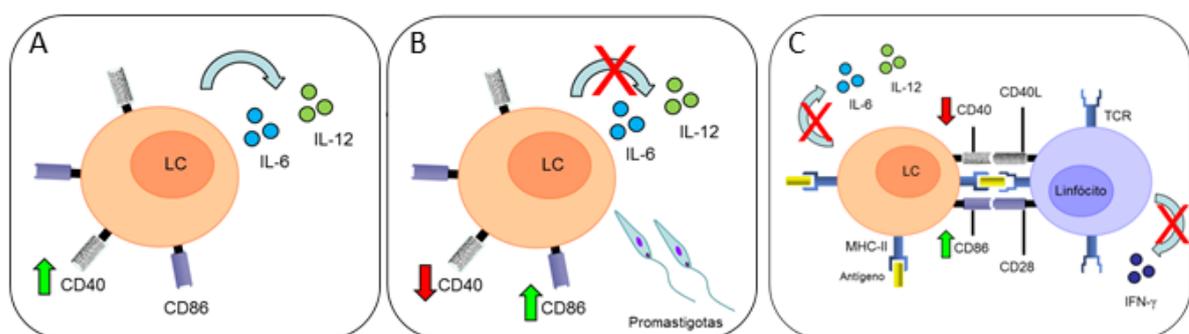


Figura 9. Síntese dos resultados obtidos. (A) TNF- α e ou anticorpo anti-CD40 estimulam a produção das citocinas IL-6 e IL-12p70 e aumentam a expressão de CD40 na superfície de LCs *in vitro*; (B) Interação com *L. amazonensis* inibe a produção de IL-6 e IL-12p70, diminui a expressão de CD40 e estimula o aumento da expressão de CD86 em LCs tratadas com TNF- α e ou anticorpo anti-CD40; (C) LCs pré-estimuladas com *L. amazonensis* não são capazes de ativar a produção de IFN- γ por células do linfonodo. (Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia)

5. DISCUSSÃO

As DCs são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra patógenos, que em contrapartida, desenvolveram diferentes mecanismos para impedir a inicialização das respostas imunológicas nos hospedeiros, por exemplo, interferindo na função das próprias DCs (SHER et al, 2003). Estudos recentes sugerem que *L. amazonensis* pode infectar e alterar a biologia das DCs, favorecendo o estabelecimento da infecção. Por outro lado, sabe-se que uma variedade de estímulos podem induzir a maturação e ativação destas células, incluindo fatores já bem caracterizados, tais como IL-1 β , TNF- α e GM-CSF (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Nesse sentido, com o objetivo de aprofundar os conhecimentos em relação ao papel das LCs durante a resposta imune contra *L. amazonensis*, o presente estudo investigou os efeitos de diferentes tratamentos na regulação da resposta imune de LCs cultivadas na presença de *L. amazonensis*.

Inicialmente verificamos que *L. amazonensis* inibiu a produção de IL-6 pelas LCs. Sabe-se que as atividades desta citocina estão profundamente ligadas à transição da imunidade inata para a imunidade adaptativa, pois atua na manutenção da inflamação de fase aguda, progressão de doenças crônicas e na maturação de diferentes tipos celulares, como por exemplo, a proliferação de células T (JONES, 2005). Portanto, a inibição da produção de IL-6 por *L. amazonensis* pode funcionar como um mecanismo de supressão da resposta imunológica mediada por LCs contra o parasita. Stäger e colaboradores (2006) demonstraram que DCs derivadas da medula óssea deficientes em IL-6, quando utilizadas em experimentos de imunoterapia em camundongos, não eram capazes de impedir a expansão de células Treg, células associadas ao desenvolvimento da infecção por *L. donovani* (STÄGER *et al.*, 2006), indicando que a IL-6 desempenha um importante papel para a função das DCs na resistência à infecção por *Leishmania* em camundongos.

Quando as LCs foram tratadas com TNF- α não foram observadas alterações significativas na produção de IL-6, no entanto quando tratadas com anti-CD40 ou anti-CD40 + TNF- α os níveis de IL-6 foram significativamente aumentados. Porém, nossos resultados mostram que quando na presença de *L. amazonensis*, os níveis de IL-6 nas culturas de LCs tratadas com anti-CD40 ou anti-CD40 + TNF- α foram reduzidos, ficando próximos aos níveis basais. Esses resultados mostram que *L. amazonensis* inibe a produção de IL-6 por LCs,

mesmo utilizando anti-CD40 ou anti-CD40 + TNF- α como estímulo. É importante ressaltar que a IL-6 foi descrita como uma citocina chave na manutenção de células T regulatórias *in vitro* (PASARE & MEDZHITOV, 2003), no entanto, juntamente com IL-12, IL-6 pode mediar a proteção do hospedeiro contra *L. donovani* (STÄGER *et al.*, 2006).

A IL-12 é uma importante citocina pró-inflamatória relacionada à resposta Th1 cuja expressão é significativamente reduzida durante a infecção por *L. amazonensis* em camundongos (JONES *et al.*, 2000). Estudos anteriores demonstraram que as DCs são capazes de internalizar amastigotas ou promastigotas de *L. major* e então liberam IL-12p40 para a iniciação de uma resposta anti-*Leishmania* (VANLOUBBEECK *et al.*, 1998; KONECNY *et al.*, 1999). Outros autores, entretanto, mostraram que a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C3H resulta em uma falha na produção de IL-12 dependente de CD40 pelas DCs (QI *et al.*, 2001), o que juntamente com outros defeitos intrínsecos a nível de ativação celular pode levar ao desenvolvimento de DCs “semi-ativadas”, descritas como células com baixa produção de IL-12 e associadas à indução de células Treg, que estão relacionadas ao fenótipo suscetível em hospedeiros infectados por *L. amazonensis* (XIN *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que *L. amazonensis* inibiu a produção de IL-12p70 por LCs após 24 h de cultura, mesmo quando as células foram tratadas com TNF- α , anti-CD40 ou anti-CD40 + TNF- α . Utilizando DCs derivadas da medula óssea de camundongos, Xin e colaboradores (2008) observaram que ambas as formas de *L. amazonensis*, amastigota e promastigota, suprimiram a produção de diferentes citocinas produzidas por estas células, incluindo IL-12p70, mesmo quando tratadas com os estímulos LPS, IFN- γ /LPS ou IFN- α /LPS (Xin *et al.*, 2008). Estes autores descreveram que a supressão da produção de IL-12 nestas células está correlacionada com a supressão da ativação da via JAK/STAT. Podemos, então, inferir que a inibição da produção de IL-12p70 causada por *L. amazonensis* em LCs, tratadas com diferentes estímulos, pode estar associada à supressão de mecanismos de sinalização intracelular, como ocorre com outros tipos de DCs. Assim, cabe investigar mais detalhadamente quais mecanismos intracelulares estão envolvidos na determinação de uma produção ineficaz de citocinas pró-inflamatórias pelas LCs em resposta à *L. amazonensis*.

A análise da expressão de CD207 nas LCs revelou que nenhum dos tratamentos e nem a interação com *L. amazonensis* ocasionou alteração no perfil de expressão desta molécula na superfície celular. Langerina/CD207 tem sido associada ao reconhecimento de patógenos em modelos de doenças infecciosas, funcionando como um receptor com importante função na captura e apresentação de antígenos a células T (STOITZNER & ROMANI, 2011). Utilizando LCs isoladas de pele humana, De Witte e colaboradores demonstraram que langerina/CD207 é capaz de se ligar a carboidratos presentes em glicoproteínas no HIV, capturando e causando degradação às partículas virais dentro dos grânulos de Birbeck, bloqueando então a transmissão do vírus às células T (DE WITTE *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que LCs isoladas de pacientes com hanseníase são capazes de apresentar antígenos não-peptídicos de *Mycobacterium leprae*, como o componente da parede celular lipoarabinomanana, a clones de células T via langerina/CD207, indicando que as LCs têm um papel especializado na apresentação de antígenos na pele (HUNGER *et al.*, 2004). De Jong e colaboradores demonstraram também que em LCs isoladas de pele humana, langerina/CD207 interage com manana e β -glucana, carboidratos presentes na parede celular de fungos. Neste estudo foi observado que langerina/CD207 se liga fortemente a uma variedade de espécies de *Candida* e *Saccharomyces* e *Malassezia furfur*, mas se liga fracamente a *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*, sugerindo que langerina/CD207 atua como um importante receptor de fungos em LCs (DE JONG *et al.*, 2010). Em nossos resultados, não foi observada relação entre *L. amazonensis* e a expressão de langerina/CD207, sendo necessária a realização de mais estudos utilizando outras ferramentas metodológicas para compreender qual o papel, ou mesmo se há alguma função, da langerina/CD207 na apresentação de antígenos de *Leishmania* por LCs. Carvalho e colaboradores (2012) observaram que a densidade de células CD207+ em lesões cutâneas de camundongos BALB/c, após 4 semanas de infecção com *L. (L.) amazonensis*, foi maior do que a densidade celular encontrada em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* ou no grupo controle. No entanto, após 8 semanas de infecção, observou-se um perfil contrário, com aumento significativo da densidade celular na infecção por *L. (V.) braziliensis* quando comparado com *L. (L.) amazonensis*, que diminuiu com a evolução da infecção, mostrando que o papel de diferentes espécies de *Leishmania* na progressão da doença em camundongos está relacionada com diferenças na expressão de DCs na epiderme (CARVALHO *et al.*, 2012).

Avaliamos também o perfil da expressão de CD40 nas LCs após interação com promastigotas de *L. amazonensis*. Trabalhos desenvolvidos por Soong e cols. (1996) mostraram que camundongos BALB/c deficientes para o gene ligante CD40 apresentam suscetibilidade aumentada à *L. amazonensis*, indicando que as interações CD40-CD40L desempenham função essencial na resposta imune celular contra parasitas intracelulares (SOONG *et al.*, 1996). Boggiatto e cols. (2009) observaram que a expressão de CD40 foi diminuída em DCs infectadas com *L. amazonensis* quando comparado com DCs infectadas com *L. major* (BOGGIATTO *et al.*, 2009). Em outro estudo, Soong e cols. (2008) relataram que a infecção de camundongos com amastigotas de *L. amazonensis* promove um perfil imaturo em DCs, com fenótipo caracterizado por baixa expressão de CD40 na superfície celular e diminuição significativa na produção de IL-12p40 (SOONG *et al.*, 2008). Em nosso estudo, observamos que a expressão de CD40 é diminuída em LCs cultivadas na presença de promastigotas de *L. amazonensis*, e que apesar da adição de TNF- α estimular o aumento da expressão de CD40 nas LCs, quando na presença de *L. amazonensis*, o tratamento não teve efeito significativo. Além disso, não foram observadas alterações após a adição de anticorpo anti-CD40. Foi demonstrado que a ativação do receptor de adenosina A_{2B} é um dos mecanismos utilizados pela *L. amazonensis* para inibir a maturação de DCs, resultando em baixa expressão de CD40 e redução na habilidade de ativar células T, o que não foi observado na infecção por *L. major* e *L. braziliensis* (FIGUEIREDO *et al.*, 2012). Dessa forma, nossos resultados mostram que *L. amazonensis* inibe a expressão de CD40 em LCs e que o tratamento com diferentes estímulos não é capaz de reverter o mecanismo de supressão do parasita.

A sinalização via moléculas co-estimulatórias B7 também tem sido associada à resposta imunológica contra parasitas de *Leishmania*, no entanto o papel destas moléculas na resistência ou suscetibilidade é ainda controverso. Inicialmente, um estudo realizado por Brown e colaboradores (1996) demonstrou que o bloqueio de CD86 em camundongos susceptíveis, mas não de CD80, resultava na diminuição da carga parasitária e na produção de citocinas Th2 após infecção por *L. major*, sugerindo que CD86 é uma molécula importante na diferenciação de células Th2 (BROWN *et al.*, 1996). Em outro estudo, Elloso e Scott (1999) mostraram que a co-estimulação envolvendo CD80 ou CD86 pode resultar tanto na produção de citocinas Th1 quanto Th2, indicando que a estimulação por meio destas moléculas é

requerida no desenvolvimento inicial tanto de respostas resistentes quanto de respostas susceptíveis à *Leishmania* em camundongos (ELLOSO & SCOTT, 1999).

Os dados obtidos em nosso trabalho mostram que *L. amazonensis* estimula o aumento da expressão de CD86 em LCs, e não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com TNF- α , anti-CD40 ou anti-CD40 + TNF- α e o grupo controle. Nossos resultados estão em acordo com dados da literatura que demonstraram que a presença de *L. amazonensis* durante a diferenciação de DCs humanas derivadas PBMC aumenta em 56% a expressão de CD86 na superfície celular. No entanto, o mesmo estudo também mostrou que ocorre uma diminuição na expressão de CD80 e de outros marcadores nestas células, o que resulta em uma provável perda de suas características como apresentadoras de antígenos, mostrando que *L. amazonensis* é capaz de modificar a via de diferenciação das DCs (FAVALI *et al.*, 2007). Outro estudo relatou efeitos similares em DCs de camundongos, que após interação com *L. amazonensis* apresentaram um aumento significativo na expressão de CD86, tanto nas células infectadas como nas não-infectadas. Porém, apesar do aumento da expressão de CD86, as DCs permaneceram em um estado de semi-maturação, não sendo capazes de ativar uma resposta eficiente de células T (PRINA *et al.*, 2004). Analisando os dados expostos acima e tendo em vista que a interação entre promastigotas e DCs leva a uma ativação fraca e transitória destas células (SOONG, 2008), podemos então inferir que *L. amazonensis* estimula a ativação das LCs *in vitro*, como evidenciado pelo aumento da expressão de CD86 nestas células, porém de maneira incompleta devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias também observada em nossos resultados.

Como discutido acima, dados da literatura demonstram que *L. amazonensis* é capaz de alterar a função de diferentes tipos de DCs, funcionando como mecanismo de supressão da resposta imunológica mediada por estas células contra o parasita. A fim de verificar se os estímulos secundários utilizados em nosso estudo podem aumentar a capacidade das LCs em gerar uma resposta contra *L. amazonensis*, nós avaliamos a produção de IFN- γ e IL-4 por células do linfonodo utilizando um modelo de co-cultura com LCs. Inúmeros trabalhos já demonstraram que IFN- γ é uma das principais citocinas envolvidas no controle da infecção por *Leishmania*, uma vez que é importante para a ativação de macrófagos e consequente produção de metabólitos de oxigênio e nitrito que conduzem à eliminação do parasita

(KAUTZ-NEU *et al.*, 2012). Em um estudo prévio, Favali e colaboradores (2007) observaram uma baixa produção de IFN- γ quando analisaram o sobrenadante de co-culturas autólogas de células T e DCs previamente diferenciadas na presença de *L. amazonensis*, e utilizadas neste experimento como APCs. Estes dados sugerem que uma resposta imune ineficiente pode ser essencial para a sobrevivência de *L. amazonensis* nas células hospedeiras infectadas (FAVALI *et al.*, 2007).

Nossos experimentos mostraram que quando as células do linfonodo foram co-cultivadas com LCs previamente estimuladas na presença de *L. amazonensis*, ocorreu uma diminuição significativa na produção de IFN- γ . Além disso, observamos que o tratamento das LCs com TNF- α , anti-CD40 ou TNF- α + anti-CD40 não alterou significativamente este resultado, pois mesmo com os tratamentos secundários as LCs previamente estimuladas na presença de *L. amazonensis* não foram capazes de ativar um aumento na produção de IFN- γ pelas células do linfonodo. Cabe ressaltar que DCs ativadas produzem IL-12p70, citocina que regula a proliferação de células Th1 e conseqüentemente a produção de IFN- γ , e o mecanismo de produção de IL-12p70 está associado à via de sinalização mediada pela ligação de CD40 (BRANDONISIO *et al.*, 2004). Portanto, os resultados obtidos nestes experimentos, associados aos baixos níveis de IL-12p70 e diminuição da expressão de CD40, que também foram encontrados em nosso estudo, sugerem que *L. amazonensis* é capaz de inibir a indução de uma resposta Th1 mediada por LCs *in vitro*.

Vários trabalhos demonstram que diferentes mecanismos geram a suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis*. IL-4 é uma citocina característica da linhagem de linfócitos do tipo Th2, e estudos prévios demonstraram sua participação na suscetibilidade de camundongos à infecção por *L. amazonensis*. Em um estudo prévio, Qi e colaboradores (2001) demonstraram que células de linfonodos de drenagem de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* podem produzir ambos os perfis de citocinas, Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10), porém a magnitude da resposta Th2, associada a uma maior expressão de IL-4 e IL-10, é responsável pelo sucesso da infecção por *L. amazonensis* quando baixos níveis de IFN- γ são encontrados. Além disso, quando DCs de BALB/c são infectadas com formas amastigotas de *L. amazonensis*, passam a secretar IL-4 e estimular a diferenciação de células T, preferencialmente para o subtipo Th2 (Qi *et al.*, 2001). Diante do

importante papel da IL-4 no direcionamento de uma resposta Th2, analisamos também a produção desta citocina nos sobrenadantes das co-culturas de células do linfonodo e LCs.

Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa na produção de IL-4 por células do linfonodo quando estas foram co-cultivadas na presença de LCs pré-estimuladas com *L. amazonensis*. Além disso, também não observamos diferença entre os grupos tratados com os estímulos secundários utilizados neste estudo. Estes resultados sugerem que as LCs de camundongos BALB/c pré-estimuladas com *L. amazonensis* não são capazes de induzir uma resposta tipo Th2 nas células do linfonodo *in vitro*. É interessante ressaltar que um estudo prévio mostrou que em camundongos infectados por *L. major* ocorre uma modulação da expressão do receptor de IL-4 em LCs, aumentando sua resposta a IL-4 e levando a uma diminuição da produção de IL-12 por estas células, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de células Th2 e levar à suscetibilidade à infecção (MOLL *et al.*, 2002).

Tendo em vista a ausência do efeito dos tratamentos utilizados neste estudo e analisando os dados expostos acima, é cabível propor que talvez o controle que o parasita exerce sobre a resposta imune mediada por LCs seja através de mecanismos intracelulares que levam à redução da produção de IL-12, principal citocina pró-inflamatória que leva a uma resposta tipo Th1. Estudos recentes apontam que o sinergismo entre receptores TLR e CD40 afetam a maturação, ativação, sobrevivência e apresentação de antígenos por DCs, podendo ativar ou não as funções anti-*Leishmania* e determinando a natureza das respostas imunes (CHANDEL *et al.*, 2014). No entanto, estudos mais detalhados são necessários para comprovar essa hipótese nas respostas mediadas por LCs.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. *L. (L.) amazonensis* exerce um efeito imunomodulador sobre a resposta imune mediada por LCs de camundongos BALB/c, sem alterar a viabilidade das células e mesmo quando estas são tratadas com estímulos secundários como TNF- α e anticorpo anti-CD40;
- 6.2. *L. (L.) amazonensis* inibe a produção das citocinas IL-6 e IL-12p70 por LCs estimuladas com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 *in vitro*;
- 6.3. A interação de LCs com *L. (L.) amazonensis* não altera a expressão de CD207, porém leva à redução da expressão de CD40 e aumento da expressão de CD86, o que caracteriza um perfil de “semi-maturação”;
- 6.4. Os tratamentos com TNF- α e/ou anticorpo anti-CD40 não alteram a expressão de CD207 e CD86 durante a interação de LCs com *L. (L.) amazonensis*, e não são capazes de reverter o mecanismo de inibição do parasita sobre a expressão de CD40 em LCs;
- 6.5. Nossos dados sugerem também que as LCs pré-estimuladas com *L. (L.) amazonensis* inibem a produção de IFN- γ por células do linfonodo, não havendo alteração da produção de IL-4;
- 6.6. Estes dados em conjunto reforçam a hipótese da existência de um mecanismo que leva a uma ativação incompleta ou à inibição das LCs por *L. amazonensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L. C.; BORGES, V.M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; DOS REIS, G.A.; DUTRA, A.N.; CLARENCIO, J.; DE OLIVEIRA, C.I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; BRODSKY, C.I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Leukoc. Biol.* v.84, p.389-396, 2008.

AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity.* v.61, p.2952-2959, 1993.

AFONSO, L.C.; SCHARTON, T.M.; VIEIRA, L.Q.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; SCOTT, P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science.* v.263, p.235-237, 1994.

AKBARI, O.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* v.2, p.725-731, 2001.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol. Lett.* v.99, p.17-23, 2005.

ALEXANDER, J.; SATOSCAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* v.112, p.2993-3002, 1999.

AMIGORENA, S.; BONNEROT, C. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. *Semin. Immunol.* v.11, p.385-390, 1999.

ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M. W.; COFFMAN, R. T.; POWRIE, F. An Essential Role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* v.190, n.7, p. 995-1003, 1999.

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European Journal of Immunology*, v.24, n.3, p.672-676, 1994.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* v.119, p.238-258, 2004.

BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* v.18, p.767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* v.392, p.245-252, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009; Caderno 11:17 – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BREWING, N.; KISSENPFFENNING, A.; MALISSEN, B.; VEIT, A.; BICKERT, T.; FLEISCHER, B.; MOSTBÖCK, S.; RITTER, U. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J. Immunol.* v.182(2), p.774-783, 2009.

BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. Leishmania tropica: pathogenicity and in vitro macrophage function in strains of inbred mice. *Experimental Parasitology*, v.48, n.1, p.81-91, 1979.

BELOSEVIC, M.; DAVIS, C. E.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. *J.Immunol.*, v.141, n.3, p.890-896, 1988.

BIRD, J. J.; BROWN, D. R.; MULLEN, A. C.; MOSKOWITZ, N. H.; MAHOWALD, M. A.; SIDER, J. R.; GAJEWSKI, T. F.; WANG, C. R.; REINER, S. L. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*. v.9, n.2, p.229-237, 1998.

BLANK, C.; BOGADAN, C.; BAUER, C.; ERB, K.; MOLL, H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology*. v.26, p.792-796, 1996.

BOGGIATTO, P. M.; JIE, F.; GHOSH, M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; RAMER-TAIT, A. E.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. A. Altered dendritic cell phenotype in response to Leishmania amazonensis amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. *The American Journal of Pathology*. v.174, n.5, p.1818-1826, 2009.

BOURGEOIS, C.; VEIGA-FERNANDES, H.; JORET, A. M.; ROCHA, B.; TANCHOT, C. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *European Journal of Immunology*. v.32, n.8, p.2199-2207, 2002.

BROWN, J. A.; TITUS, R. G.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. Blockade of CD86 ameliorates Leishmania major infection by down-regulating the Th2 response. *J. Infect. Dis.* V.174, p.1303-1308, 1996.

CAMUSET, G.; REMY, V.; HANSMANN, Y.; CHRISTMANN, D.; GOMES DE ALBUQUERQUE, C.; SENA CASSEB, G.A. Mucocutaneous leishmaniasis in Brazilian Amazonia. *Med. Mal. Infect.* v.37(6), p.343-346, 2007.

CARVALHO, A.K.; SILVEIRA, F.T.; PASSERO, L.F.D.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. *Parasite Immunology.* v.34, p.395-403, 2012.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* v.180, p.1263-1272, 1994.

CHATELAIN, R.; MAUZE, S.; COFFMAN, R. L. Experimental Leishmania major infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol.* v.21, n.4, p.211-218, 1999.

CLAUSEN, B.E.; KEL, J.M. Langerhans cells: critical regulators of skin immunity? *Immunol Cell Biol.* v.88(4), p.351-360, 2010.

CONSTANT, S. L.; BROGDON, J. L.; PIGGOTT, D. A.; HERRICK, C. A.; VISINTIN, I.; RUDDLE, N. H.; BOTTOMLY, K. Resident lung antigen-presenting cells have the capacity to promote Th2 T cell differentiation in situ. *J. Clin. Invest.* v.110, n.10, p.1441-1448, 2002.

COOLS, N.; PONSAERTS, P.; VAN TENDELOO, V.F.I.; BERNEMAN, Z.N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* v.82, p.1365-1374, 2007.

CURTSINGER, J.M.; LINS, D.C.; MESCHER, M.F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naïve CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J. Exp. Med.* v.197, p.1141-1151, 2003.

CURTSINGER, J.M.; SCHMIDT, C.S.; MONDINO, A.; LINS, D.C.; KEDL, R.M.; JENKINS, M.K.; MESCHER, M.F. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naïve CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* v.162, p.3256-3262, 1999.

DE ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection. Analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.98, p.861-870, 2003.

DE JONG, M.A.; VRIEND, L.E.; THEELEN, B.; TAYLOR, M.E.; FLUITSMA, D.; BOEKHOUT, T.; GEIJTENBEEK, T.B. C-type lectin Langerin is a betaglucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol. Immunol.* v.47, p.1216-1225, 2010.

- DE WITTE, L.; NABATOV, A.; PION, M.; FLUITSMA, D.; DE JONG, M. A., DE GRUIJL T., FIGUET V. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat. Med.* v.13, p.367-371, 2007.
- ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. Expression and contribution of B7-1(CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* v.162, p.6708-6715, 1999.
- FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *The Journal of Leukocyte Biology.* v.61, n.3, p.246-257, 1997.
- FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARÊNCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; BRODSKY, C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *The Journal of Leukocyte Biology.* v.82, p.1401-1406, 2007.
- FIGUEIREDO, A.B.; SERAFIM, T.D.; MARQUES-DA-SILVA, E.A; MEYER-FERNANDES, J.R.; AFONSO, L.C.C. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *Eur. J. Immunol.* v.42, p.1203-1215, 2012.
- CHANDEL, H.S.; PANDEY, S.P.; ROY, S.; DOYEN, N.; SAHA, B. TLR-CD40 cross-talk in anti-leishmanial immune response. *Front. Immunol.* v.5, p.1-5, 2014.
- FEHÉRVARI, Z. AND SAKAGUCHI S. CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest.* v. 114, n.9, p. 1209-1217, 2004.
- FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K.J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C.J.; SCHREIBER, R.; MAK, T.W.; BLOOM, B.R. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* v.2, n.6, p.561-572, 1995.
- GOMES, I.N.; CALABRICH, A.F.; TAVARES, R. da S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L.A.; VERAS, P.S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes.Infect.* v.5, n.4, p.251-260, 2003.
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology.* v.145, n.4290-4297, 1990a.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism. *The Journal of Immunology.* v.144, n.1, p.278-283, 1990b.

GROUX, H.; COTTREZ, F.; ROULEAU, M.; MAUZE, S.; ANTONENKO, S.; HURST, S.; MCNEIL, T.; BIGLER, M.; RONCAROLO, M. G.; COFFMAN, R. L. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen presenting cells. *The Journal of Immunology*. v.162, n.3, p.1723-1729, 1999.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* v.20, p.621-667, 2002.

GUERY, J. C.; GALBIATI, F.; SMIROLDO, S.; ADORINI, L. Selective development of T helper (Th)2 cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta(2)-microglobulin-deficient BALB/c mice. *J.Exp.Med.* v.183, n.2, p.485-497, 1996.

HANAU, D.; GACHET, C.; SCHIMITT, P.A.; OHLMANN, P.; BRISSON, C.; FABRE, M.; CAZENAVE, J.P. Ultrastructural similarities between epidermal Langerhans cell Birbeck Granules and the surface-connected canalicular system of EDTA-treated human blood platelets. *J. Invest. Dermatol.* v.97, p.756-762, 1991.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*. v.169, p.59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v.88, n.16, p.7011-7015, 1991.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*. v.177, n.5, p.1505-1509, 1993.

HOSKEN, N. A.; SHIBUYA, K.; HEATH, A. W.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J.Exp.Med.* v.182, n.5, p.1579-1584, 1995.

HUGUES, S. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. *Semin. Immunopathol.* v.32, p.227-238, 2010.

IGYARTO, B.Z.; KAPLAN, D.H. The evolving function of Langerhans cells in adaptative skin immunity. *Immunol Cell Biol.* v.88(4), p.361-365, 2010.

INABA, K.; STEINMAN, R.M. Protein-specific helper T-cell formation initiated by dendritic cells. *Science*. v.229, p.475-479, 1985.

Jl, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* v.66, n.4, p.338-345, 2002.

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. v.71, n.8, p.4278-4288, 2003.

JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology*. v.165, n.1, p.364-372, 2000.

JONES, S.A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *The Journal of Immunology*. v.175, p.3463-3468, 2005.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. v.166, n.2, p.1141-1147, 2001.

KAUTZ-NEU, K.; NOORDEGRAAF, M.; DINGES, S.; BENNET, C.L.; JOHN, D.; CLAUSEN, B.E.; VON STEBUT, E. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *J Exp Med*. v.208(5), p.885-891, 2011.

KAUTZ-NEU, K.; SCHWONBERG, K.; FISCHER, M. R.; SCHERMANN, A. I.; STEBUT, E. V. Dendritic cells in *Leishmania* major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol*. v.201, p.581-592, 2012.

KIMBER, I.; CUMBERBATCH, M. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J. Invest. Dermatol.* v.99, p.48S-50S, 1992.

KONECNY, P.; STAGG, A. J.; JEBBARI, H.; ENGLISH, N.; DAVIDSON, R. N.; KNIGHT, S. C. Murine dendritic cells internalize *Leishmania* major promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur. J. Immunol.* v.29, p.1803-1811, 1999.

KUCHROO, V. K.; DAS, M. P.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. v.80, n.5, p.707-718, 1995.

KULIDJIAN, A. A.; ISSEKUTZ, A. C.; ISSEKUTZ, T. B. Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. *Int.Immunol.* v.14, n 7, p.751-760, 2002.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Brasília, v.18, p.47-56, 1985.

LAINSON, R. Leishmania e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. *Rev. Paranaense de Medicina.* v.11(1), p.29-40, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in Biology and Medicine.* London: Academic Press; vol. 1, p.20, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SOUZA, A.A.A.; SILVEIRA, F.T.; FALQUETO, A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.87(3), p.437-439, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis – The Neotropical Leishmania Species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., vol. 5 Parasitology, Arnold, London, p.242-266, 1998.

LAUNOIS, P.; OHTEKI, T.; SWIHART, K.; MACDONALD, H. R.; LOUIS, J. A. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. *European Journal of Immunology.* v.25, n.12, p.3298-3307, 1995.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; CONCEICAO-SILVA, F.; MILON, G.; LOUIS, J.A. T-cell responses elicited by *Leishmania major* in mice. In: *Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis.* Eds. Tapia, F.J.; Caceres- Dittmar, G. & Sanches, M.A., p.4032-4039, 1996.

LEIST, M.; GANTNER, F.; BOHLINGER, I.; TIEGS, G.; GERMANN, P. G.; WENDEL, A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.* v.146, n.5, p.1220-1234, 1995.

LEMOES, de Souza, V; ASCENCAO, Souza J.; CORREIA SILVA, T. M.; SAMPAIO, Tavares, V; RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes.Infect.* v.2, n.15, p.1807-1815, 2000.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.*, v.213, p.377-387, 2008.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology.* v.145, n.4306-4310, 1990.

LOCKSLEY, R.M.; HEINZEL, F.P.; FRANKHAUSER, J.E.; NELSON, C.S.; SADICK, M.D. Cutaneous host defense in Leishmaniasis: interaction of isolated dermal macrophages and epidermal Langerhans cells with the insect-stage promastigote. *Infection and Immunity*. v.56, p.336-342, 1988.

MACKAY, F.; LOETSCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *The Journal of Experimental Medicine*. v.177, n.5, p.1277-1286, 1993.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection. *The Journal of Immunology*, v.164, n.3, p.1458-1462, 2000.

MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K.H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper Type 1 responses by Bordetella pertussis. *J. Exp. Med.* v.195, p.221-231, 2002.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol.Rev.* v.201, p.206-224, 2004.

MELIEF, C. J. Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *European Journal of Immunology*. v.33, n.10, p.2645-2654, 2003.

MELLMAN, I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. v.560, p.63-67, 2005.

MITCHELL, G.F.; CURTIS, J.M.; SCOLLAY, R.G.; HANDMAN, E. Resistance and abrogation of resistance to cutaneous leishmaniasis in reconstituted BALB/c nude mice. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* v.59, n. Pt 5, p.539-554, 1981.

MOLL, H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunology Today*. v.14, p.383-387, 1993.

MOLL, H.; FLOHÉ, S.; RÖLLINGHOFF, M. Dendritic cells in Leishmania major-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T-cell immune response. *European Journal of Immunology*. v.25, p.693-699, 1995.

MOLL, H.; SCHARNER, A.; KAMPGEN, E. Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-Induced decrease in IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*. v.70, n.3, p.1627-1630, 2002.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL, Malefyt R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. *Annual Review of Immunology*. v.11, n.165-190, 1993.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. *Adv.Immunol.* v.56, n.1-26, 1994.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Rev. Immunol.* v.7, p.145-173, 1989.

NOBEN-TRAUTH, N.; PAUL, W. E.; SACKS, D. L. IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *The Journal of Immunology*. v.162, n.10, p.6132-6140, 1999.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*. v.299. p.1033-1036, 2003.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P. S.; KRONKE, M.; MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. v.73, n.3, p.457-467, 1993.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J.Clin.Invest.* v.91, n.4, p.1390-1395, 1993.

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, J. C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell Sci.* v.117, Pt2, n.315-325, 2004.

QI, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4+T cells in vivo. *J. Immunol.* v.167(8), p.4534-4542, 2001.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. v.72, n.2, p.988-995, 2004.

QIGUI, Y.; GU, J. X.; KOVACS, C.; FREEDMAN, J.; THOMAS, E. K.; OSTROWSKI, M. A. Cooperation of TNF family members CD40 ligand, receptor activator of NF- κ B ligand,

and TNF- α in the activation of dendritic cells and the expansion of viral specific CD8⁺ T cell memory responses in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. *J Immunol.* v.170, p.1797-1805, 2003.

RAMOS, P.K.S.; BRITO, M.V.; SILVEIRA, F.T.; SALGADO, C.G.; DE SOUZA, W.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; DINIZ, J.A.P. In vitro cytokines profile and ultrastructural changes of microglia and macrophages following interaction with *Leishmania*. *Parasitology.* v.1, p.1-12, 2014.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Rev. Immunol.* v.13, p.151-177, 1995.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* v.7(9), p.581-96, 2007.

RITTER, U.; LECHNER, A.; SCHARL, K.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; KORNER, H. TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of *Leishmania major* infection. *Med Microbiol. Immunol.* v.197, p.29-37, 2008.

RITTING, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol. Today.* v.16, p.292-297, 2000.

RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A. Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v.1, n.4, p.383-395, 1987.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* v.55, p.453-83, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat.Rev.Immunol.* v.2, n.11, p.845-858, 2002.

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine.* v.171, n.115-127, 1990.

SALGADO, C.G.; NAKAMURA, K.; SUGAYA, M.; TADA, Y.; ASAHINA, A.; FUKUDA, S.; KOYAMA, Y.; IRIE, S.; TAMAKI, K. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* v.113, p.1021-1027, 1999.

SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. v.254, n.5029, p.279-282, 1991.

SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*. v.4 Suppl 3, p.S127-S132, 2002.

SCHOENBERGER, S. P.; TOES, R. E.; VAN, der, V; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. v.393, n.6684, p.480-483, 1998.

SCHULAR, G.; STEINMAN, R.M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*. v.161, p.526-546, 1985.

SCHULZ, O.; EDWARDS, A.D.; SCHITO, M.; ALIBERTI, J.; MANICKASINGHAM, S.; SHER, A.; REIS E SOUSA, C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity*. v.13, p.453-462, 2000.

SCHWARTZ, R.H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol*. v.21, p.305-334, 2003.

SCOTT, P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. *Parasite Immunol*. v.7, n.3, p.277-288, 1985.

SCOTT, P.; SACKS, D.; SHER, A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. v.131, n.2, p.966-971, 1983.

SHAW, J. J.; FARIA, D.L.; BASANO, S.A.; CORBETT, C.E.; RODRIGUES, C.J.; ISHIKAWA, E.A. The aetiological agents of American cutaneous leishmaniasis in the municipality of Monte Negro, Rondônia state, western Amazonia, Brazil. *Annals Tropical Medicine and Parasitology*, Liverpool, v. 101, n. 8, p. 681-688, 2007.

SHER, A.; PEARCE, E.; KAYE, P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*. v.15, p. 421-429, 2003.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; DE SOUZA, A. A.; ISHIKAWA, E. A.; BRAGA, R. R. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.85, n.6, p.735-738, 1991.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; DE BRITO A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; DE SOUZA, A.A.A.; DA SILVA, B.M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R.N.Q. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Editora CEJUP, p.619-30, 1997.

SILVEIRA F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.99(3), p.239-251, 2004.

SILVEIRA F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.100(5), p.525-34, 2005.

SILVEIRA F.T.; LAINSON, R.; GOMES, C.M. DE C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology.* v.31(8), p.423-31, 2009.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* v.74, p.275-317, 2000.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol.* v.180(7), p. 4355-4360, 2008.

SOONG, L.; XU, J.-C.; GREWAL, I. S.; KIMA, P. E.; SUN, J.; MCMAHON-PRATT, D.; FLAVELL, R. A. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity.* v.4, p.263-273, 1996.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J., Jr.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *The Journal of Immunology.* v.158, n.11, p.5374-5383, 1997.

STÄGER, S.; MAROOF, A.; ZUBAIRI, S.; SANOS, S.L.; KOPF, M.; KAYE, P.M. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+CD4+ T Cells. *Eur J Immunol.* v.36(7). P.1764-1771, 2006.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* v.137, p.1142-1162, 1973.

STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev.* v.53, p.127-147, 1980.

STEINMAN, R.M.; WITMER, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.75, p.5132-5136, 1978.

STENGER, S.; THURING, H.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Experimental Medicine*. v.180, n.3, p.783-793, 1994.

STOITZNER, P.; ROMANI, N. Langerin, the “Catcher in the Rye”: An important receptor for pathogens on Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* v.41, p.2526-2529, 2011.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H.; GOEDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. v.74, n.5, p.845-853, 1993.

TERABE, M.; KURAMOCHI, T.; ITO, M.; HATABU, T.; SANJOBA, C.; CHANG, K. P.; ONODERA, T.; MATSUMOTO, Y. CD4+ cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity*. v.68, n.8, p.4574-4577, 2000.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat.Rev.Immunol.* v.2, n.10, p.735-747, 2002.

UENO, H.; KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; ASPORD, C.; CAO, T.; MATSUI, T.; DI PUCCHIO, T.; CONNOLLY, J.; FAY, J.W.; PASCUAL, V.; PALUCKA, A.K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. v.219, p.118–142, 2007.

VALLADEAU, J., CLAIR-MONINOT, V., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. *et al.* Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J.Immunol.* v.168, p.782-792, 2002.

VALLADEAU, J., RAVEL, O., DEZUTTER-DAMBUYANT, C. *et al.* Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. v.12, p.71-81, 2000.

VALLADEAU, J.; SEALAND, S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* v.17(4), p. 273-283, 2005.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu.Rev.Immunol.* v.10, n.411-452, 1992.

VIETH, M.; WILL, A.; SCHROPPEL, K.; ROLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scand.J.Immunol.* v.40, n.4, p.403-409, 1994.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from urine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J. Exp. Med.* v.188, p. 1547-1552, 1998.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infection and Immunity*. v.75, n.6, p.2802-2810, 2007.

WONG, G. H.; GOEDEL, D. V. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *The Journal of Immunology*. v.152, n.4, p.1751-1755, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 2010.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1 β in activating the CD11C^{high} CD45RB⁻ dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T cells in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*. v.75, n.10, p.5018-5026, 2007.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cells signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol*. v.45(12), p.3371-3382, 2008.

YOUNG, J.W.; KOULOVA, L.; SOERGEL, S.A.; CLARK, E.A.; STEINMAN, R.M.; DUPONT, B. The B7/ BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4⁺ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest.* v.90, p.229-237, 1992.

ZHANG, S.; WANG, Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: regulatory mechanism for IL-12p70 synthesis and inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.372, p.509-512, 2008.